

**“Über die Wirkung einiger spezifisch  
hautwirksamer Anitbiotika  
auf embryonale Gewebe und  
Zellen in Kultur.”**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Biologie (23)  
der Freien Universität Berlin**

---

vorgelegt von  
**Robert Lipp**  
aus Berlin

**1975**

---



**“Über die Wirkung einiger spezifisch  
hautwirksamer Anitbiotika  
auf embryonale Gewebe und  
Zellen in Kultur.”**

**Inaugural-Dissertation**  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Biologie (23)  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Robert Lipp**  
aus Berlin





1. Gutachter : Prof.Dr.Dr.R.Riemschneider
2. Gutachter : Prof.Dr.E.-R.Lochmann
3. Gutachter :

Tag der mündlichen Prüfung : 29.8.1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4



## Inhaltsverzeichnis:

|                                                                                         | <u>Seite</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Einleitung:                                                                             |              |
| 1. Problemstellung                                                                      | 1            |
| 2. Biochemische Mechanismen<br>der Antibiotika-Wirkung                                  | 4            |
| Literaturverzeichnis                                                                    | I-XVI        |
| Experimentelle Untersuchungen:                                                          |              |
| Material und Methodik: "Kultur in hängenden<br>Tropfen"                                 | 23           |
| Literaturverzeichnis                                                                    | XVII         |
| Versuchsgruppe:                                                                         |              |
| I: PENICILLIN                                                                           | 27           |
| II: STREPTOMYCIN u. DIHYDROSTREPTOMYCIN                                                 | 32           |
| III: KANAMYCIN                                                                          | 39           |
| IV: GENTAMYCIN                                                                          |              |
| 1. Wirkung des Gentamycins<br>auf embryonale Gewebe                                     | 44           |
| 2. Wirksamkeit auf embryonale<br>Nierengewebe                                           | 85           |
| 3. Wirkung auf embryonale<br>Hautgewebe                                                 | 94           |
| V: TETRACYCLINE                                                                         |              |
| 1. TETRACYCLIN-HCl                                                                      | 100          |
| 2. OXYTETRACYCLIN-<br>HYDROCHLORID                                                      | 111          |
| 3. PYRROLIDINO-METHYL-<br>TETRACYCLIN                                                   | 126          |
| 4. TETRACYCLIN<br>kristallin                                                            | 143          |
| 5. METHACYCLINUM                                                                        | 146          |
| 6. DOXYCYCLIN                                                                           | 152          |
| 7. MINOCYCLINUM                                                                         | 158          |
| Wirkung des Minocyclins<br>auf embryonale tierische<br>und adulte menschliche<br>Gewebe |              |

|                                                                                                     | <u>Seite</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| DISKUSSION :                                                                                        |              |
| 1. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren                                       | 188          |
| PENICILLIN                                                                                          | 188          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | XVIII-XXVI   |
| STREPTOMYCIN                                                                                        | 202          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | XXVII-XXXII  |
| KANAMYCIN                                                                                           | 211          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | XXXIII       |
| GENTAMYCIN                                                                                          | 214          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | XXXIV-XXXVI  |
| TETRACYCLINE                                                                                        | 226          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | XXXVII-XLIX  |
| 2. Wie kann man sich den Metabolismus der Antibiotika in der tierischen Zelle in Kultur vorstellen? | 254          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | L - LIII     |
| 3. Die Ergebnisse der Wirkungen von Antibiotika auf embryonale und erwachsene Tiere                 | 270          |
| PENICILLIN                                                                                          | 270          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | LIV - LVII   |
| STREPTOMYCIN                                                                                        | 275          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | LVIII - LXII |
| KANAMYCIN                                                                                           | 280          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | LXIII - LXV  |
| GENTAMYCIN                                                                                          | 283          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | LXVI - LXX   |
| TETRACYCLINE                                                                                        | 290          |
| Literaturverzeichnis                                                                                | LXXI - LXXXV |
| Zusammenfassung:                                                                                    | 308          |

Die vorliegende Arbeit wurde in der Hautklinik und - Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhaus und im Pathologischen Institut des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses in der Zeit von 1969 bis 1974 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. STÜTTGEN danke ich für die Anregungen zur Bearbeitung dieses Themas. Herrn Prof. Dr. R. RIEMSCHEIDER aber für die intensive Beratung hinsichtlich der biologisch-chemischen Fragestellung und die engagierte wissenschaftliche Betreuung. Herrn Prof. Dr. Ing. E.-R. LOCHMANN gilt besonderer Dank für viele anregende Gespräche zu dieser Arbeit.

Das freundliche Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. F. STEIN im Pathologischen Institut des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses durch die Überlassung der Zell- und Gewebekultur-Abteilung waren für mich eine große Hilfe.

Aus der Hautklinik und -Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhaus.





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41533913\\_0023](https://archive.org/details/IA41533913_0023)

Einleitung:

1. Problemstellung

Heute, da in verstärktem Maße die Nebenwirkungen der Arzneimittel aufgedeckt werden, ist es eine notwendige Forderung an den experimentell-arbeitenden Biologen, zur Aufklärung dieser Mechanismen beizutragen.

Beispiel für diese Nebenwirkungen ist die intrauterine Teratogenität durch das Thalidomid-Präparat "CONTERGAN".

(1-3) Der Phenacetin-Abusus führt nach 10 bis 15 Jahren zu Nierenschäden mit Schrumpfung und Nekrose.

Rauwolfia-Medikation soll nach den neuesten Untersuchungen die Genese des Mamma-Karzinoms beeinflussen.

Der Wert der Gewebekultur für die Aufdeckung solcher schädlicher Nebenwirkungen soll im Folgenden für die Antibiotika herausgestellt werden.

Die Gewebekultur bietet explantierten Geweben die Möglichkeit sich unabhängig von Einflüssen des Organismus oder der Nachbargewebe zu entwickeln. Durch das Nährmedium und das Kulturgefäß werden sowohl neue Entwicklungsreize vermittelt als auch Grenzen des Wachstums gesetzt. Für das Verhalten explantierter Gewebe und Zellen sind einige Faktoren wichtig: 1) Die Art des Wachstums in Kultur. 2) Der Zellstoffwechsel und 3) Die Wirkung chemischer Substanzen auf die Zelle.

Der Verlauf des Wachstums in Kultur hängt neben den proliferativen Potenzen des Explantats von vielen äußeren Faktoren ab: Die mechanischen Bedingungen des Kulturmilieus. - Embryonales Bindegewebe wächst am üppigsten, wenn sich die Zellen dreidimensional anordnen können, z.B. mittels der Kulturmethode "im hängenden Tropfen". Im Gegensatz dazu bevorzugt das Epithel eine zweidimensionale Ausbreitung.

Wachsende und sich mitotisch vermehrende Zellen decken den größten Teil ihres Nahrungsbedarfes aus präformierten Eiweißstoffen des Embryonalextraktes, andererseits aus

niedrigmolekularen Körpern der das Bioplasma aufbauenden Aminosäuren. Drittens: Wirkungen chemischer Substanzen auf die Zelle können sich als Zellstimulatoren oder als Zellinhibitoren äußern. Gewebe- und Zellkulturen sind für die Feststellung der Initial-Toxizität, auch der Antibiotika, unbedingt notwendig. Für die Aufklärung des pharmakologischen und metabolischen Aktionsmechanismus von Arzneisubstanzen, hier der verschiedensten Antibiotika, sind sie nützlich oder sogar unerlässlich.

Im Gegensatz zu Tierversuchen hat die Gewebe- und Zellkultur viele Vorteile. Allein die Unterbringung, Ernährung und Wartung von Versuchstieren macht Schwierigkeiten. Auch wird die Möglichkeit einer bakteriellen oder Virus-Kontamination zu bedenken sein.

Ein weiterer Vorteil der in vitro-Pharmakologie liegt in dem Umfang von Geweben und Zellen, die in Kultur verwendet und mit den Prüfsubstanzen konfrontiert werden können. Ein Arzneisubstanz-Effekt kann dadurch an Fibroblasten, Epithelzellen, Nervenzellen, am Knochenmark und Knorpelgeweben und an anderen Zelltypen getestet werden. Der zellwirksame Effekt der Prüfsubstanz kann durch das Mikroskop beobachtet und mikrofotografisch dokumentiert werden. Viele Beobachtungen über die Mitose, Zytomorphologie und Zellbewegungen sind nötig, um die Unterschiede zwischen den Testkulturen und den Kontrollen festzuhalten. Aber es muß auch klargemacht werden, daß in der Kultur eine Vielzahl von Veränderungen erfolgen kann, die z.B. die unterschiedlichen metabolischen Aktivitäten der Zellen auf Grund verschiedener Altersstufen umfassen.

Die in vitro-Pharmakologie hat auch ihre Grenzen, denn sie kann nur den direkten Effekt einer Arzneisubstanz auf oder in einer Zelle anzeigen. Daher muß bedacht werden, daß mögliche Veränderungen der Substanz unter den Experiment-Bedingungen auftreten, aber es muß weiter si-

cher sein, daß sie nicht während der Experiment-Periode bei einer ständigen Temperatur von 37 ° C eintreten können und dürfen.

Die Prüfung von Arzneisubstanzen, hier der Antibiotika, auf ihre Toxizität und ihre therapeutische Wirksamkeit hat die Gewebekultur als eine jederzeit reproduzierbare Möglichkeit noch wenig genützt, obwohl die Entwicklung neuerer und leichter standardisierbarer Techniken und Testmethoden dringend erforderlich ist. Sehr viele Publikationen sind seit der Entdeckung des Penicillins über die Antibiotika-Therapie und ihre Wirkungs-Mechanismen verfaßt worden, nur ein kleiner Teil über ihre Wirkung auf die Zellkultur.

#### Literaturverzeichnis für Einleitung

- (1) RIEMSCHEIDER, R., BROCKMEYER, H. und SOMMER, H.  
Teratogene Wirkung organischer Verbindungen I.  
Eine Laboratoriums-Testmethode  
Z. Naturforschg. 18 b, 167-168 (1963)
- (2) RIEMSCHEIDER, R., BROCKMEYER, H.  
Teratogene Wirksamkeit organischer Verbindungen, III,  
weitere Thalidomid-Versuche  
Z. Naturforschg. 18 b, 584-585 (1963)
- (3) RIEMSCHEIDER, R. und TROST, W. , IV  
Weitere Thalidomid-Versuche (im Druck)



## 2. Biochemische Mechanismen der Antibiotika-Wirkung

Antibiotika sind chemische Substanzen, die von verschiedenen Spezies der Mikroorganismen, Bakterien, Pilzen und Actinomyceten produziert werden. Sie unterdrücken das Wachstum anderer Mikroorganismen oder zerstören sie. Sie unterscheiden sich durch physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften, antibakterielle Spektren und ihren Aktionsmechanismus. Das ideale therapeutische Agens sollte sich durch selektive und effektive antimikrobielle Aktivität gegenüber den Mikroorganismen auszeichnen. Es muß eher bakterizid als bakteriostatisch sein und darf keine signifikante bakterielle Resistenz induzieren. Die Substanz eines Antibiotikums sollte nicht wie ein sensitives Agens wirken oder vitale Organe und Funktionen zerstören. (L. WEINSTEIN)

Um diese Aggressivität der Antibiotika zu beweisen, wurden diese notwendigen Untersuchungen begonnen und ausgeführt. Das Verständnis der zellulären Pharmakologie führt zu der Erkenntnis, daß die Wirkung der Antibiotika eine molekularbiologische Reaktion darstellt, bei der die Antibiotika als potentielle Markierungen dienen können, um metabolische Abläufe und Reaktionen in den Zellen festzustellen.

Tierische und Bakterien-Zellen besitzen ein auffallendes Unterscheidungsmerkmal in ihrer allgemeinen Struktur. Die tierische Zelle ist relativ groß und besitzt eine komplexe Organisation mit Zellkern, Mitochondrien und verschiedenen anderen Organellen. Die Zellmembran ist dünn und wenig stabil. Aber die tierische Zelle lebt in einer Umwelt mit kontrollierter Temperatur und Osmolarität. Sie wird ständig von der Flüssigkeit, die sie umgibt, mit Nährstoffen versorgt. Die kleinere Bakterienzelle dagegen lebt in viel ungünstigeren Umständen. Zum Schutz vor widrigen Schwankungen der Osmolarität ist sie

durch eine starke, feste Außenhülle geschützt - die Zellwand. Sie ist das typische Merkmal für die Bakterienzelle und fehlt bei tierischen Zellen ganz. Hochaktive anti-bakterielle Substanzen verdanken ihre Wirkung der Fähigkeit, die Synthese der Zellwand zu stören.

Untersuchungen auf dem Gebiet der Bakterien-Zellwandstruktur, der Membran-Struktur, der Ribosomen-Struktur und ihrer Funktionen sowie der Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen haben ihren Anteil dazu beigetragen, den Wirkungsmechanismus der Antibiotika aufzuklären. (1)

| Antibiotikum        | Wirkung                          | Molekularer Mechanismus                                                      |
|---------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| PENICILLINE         | Bakterizide Inhibition           | Inhibition der Mucopeptid-Synthese                                           |
| STREPTOMYCIN        | Hemmung gram-negativer Bakterien | Bakterizide<br>/                                                             |
| DIHYDROSTREPTOMYCIN | "                                | Inhibitoren der Proteinsynthese, Synthese von DNA und RNA nicht beeinflusst. |
| KANAMYCIN           | "                                | "                                                                            |
| NEOMYCIN            | "                                | "                                                                            |
| GENTAMYCIN          | "                                | "                                                                            |
| TETRACYCLINE        | Hemmung von Bakterien            | Bakteriostatische Inhibition der Proteinsynthese                             |

Tabelle 1: Antibiotika und molekulare Mechanismen

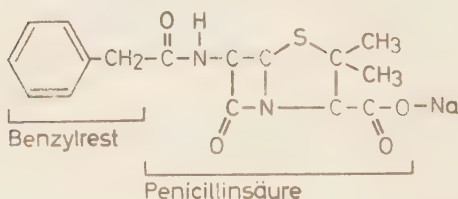
Die Struktur der bakteriellen Zellwände ist im Gegensatz zu denen tierischer Zellen unterschiedlich. Zwei Hauptarten von Zellwänden sind beobachtet worden, die nach der

Reaktion der Bakterien auf die Giemsa-Färbung eingeteilt werden. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien, z.B. *Staphylococcus aureus*, die über der Zellmembran liegt, besteht aus zwei Hauptschichten, der Teichonsäure und aus Murein. Sie ist von faseriger Konsistenz und der eigentliche tragende und widerstandsfähige Teil der Zellwand. (2)

Die Struktur der Zellwand gramnegativer Bakterien, z.B. *Escherichia coli*, ist komplexer. Die Zellmembran besteht aus zwei dichten Schichten, zwischen denen sich ein heller Zwischenraum befindet. Die Zellwand besteht aus drei dichten Schichten, die durch helle Schichten getrennt werden. Die gesamte Zellwand besteht somit aus mindestens fünf Schichten. Ein Merkmal ist beiden Bakterien-Arten gemeinsam, das Murein. Das strukturelle Element der Bakterien-Zellwand, das Murein, besteht aus N-acetylglucosamin und N-acetylmuramin-Säure- $\beta$ -1,4. Das dreidimensionale Murein gibt der Bakterienzelle eine strukturelle Integrität. Eine Zerstörung dieser Struktur durch Enzyme oder durch Antibiotika führt zu einer osmotischen Instabilität und Lyse.

Beobachtungen bestätigen die Effektivität des PENICILLINS gegen gram-positive Bakterien. (3)

#### Penicillin G (Na-Salz)



#### F.1. Struktur-Formel des PENICILLIN-G.

aus M. FRIMMER: Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 1971

Die erste wichtige biochemische Entdeckung der "penicillin action" stammt von PARK und JOHNSON (4), die herausfanden, daß die Ansammlung von Uridine-Peptiden in Zellen, die mit PENICILLIN behandelt wurden, erfolgt. Diese Uridin-5'-pyrophosphat-Derivative sind Vorläufer der Bakterien-Zellwand-Mureine (5). Sie stellen damit das Basalstrukturelement der Zellwand dar. Eines dieser Elemente war das Uridin-diphosphat (UDP)-N-acetyl-muramyl-peptid, obwohl die Identität der Muraminsäure noch nicht bekannt war. Erst 1957 wurde durch die Analyse von isolierten Zellwänden die Struktur bekannt. (6)

PARK und STROMINGER (6) entdeckten eine Korrelation zwischen der Zusammensetzung der Nucleotide und den Zellwand-Mureinen. Sie konnten daher vorhersagen, daß PENICILLIN etwas mit der Hemmung der Zellwandsynthese zu tun haben mußte.

Eine visuelle Bestätigung dieser PENICILLIN-Aktivität wurde durch die Elektronen-Mikroskopie erreicht, denn hier konnte gezeigt werden, daß die Zellwände in Gegenwart von PENICILLIN zunehmend dünner wurden. (7)

PENICILLIN inaktiviert vermutlich wirksam die Transpeptidase. Dieses Ferment ist wahrscheinlich die "penicillin binding component", die Jahre vorher entdeckt wurde. (8) Die PENICILLIN-Wirkung auf Bakterien äußert sich in morphologischen und zytochemischen Veränderungen mit anschließender Mitoseinhibition. (9,10) Distorsionen in den Bakterienzellen lassen sich durch Vitalfärbungen sichtbar machen. (11) Normal lebende Zellen akkumulieren die Farbstoffe in den Vakuolen. Unter PENICILLIN-Einwirkung geht diese Fähigkeit verloren. (12a-c)

Die Bakterienzellen lagern sich unter PENICILLIN-Einfluß zu Kolonien zusammen. Bei gleichzeitiger Vergrößerung des Lumens bilden sich Riesenformen. (13) Die Zellen können 750 Moleküle PENICILLIN ohne einen Effekt auf das Wachstum binden. Mit 1500-1700 Molekülen pro Zelle setzt eine Wachstumsinhibition ein. Wenn 1500-2000 Moleküle



PENICILLIN an die Zelle gebunden sind, dann erst tritt eine bakterizide Aktion ein. (14) Konzentration ist bei Arbeiten mit Antibiotika ein wichtiger Faktor. Bei kleinsten Konzentrationen haben Antibiotika keinen Effekt auf Mikroorganismen oder haben sogar eine Wirkung auf die Zellproliferation, indem sie das Wachstum stimulieren. Bei der Arbeit mit Gewebekulturen wird festgestellt, daß eine große Differenz zwischen toxischen Konzentrationen für Mikroorganismen und für tierische Zellen in Kultur besteht. Diese Möglichkeit hat dazu geführt, sie in der Gewebe-Kultur-Technik zu verwenden. (15) Auf die biochemischen Parallelen der Lyse durch virulente Phagen bei E.coli oder durch PENICILLIN-bedingte Lyse gingen verschiedene Autoren ein. (16-18)

Besonders PENICILLIN-empfindlich sind junge Bakterienzellen während der Proliferationsphase mit ihrem großen Sauerstoffbedarf. Ausgereifte Bakterienzellen sind unempfindlicher, da sie gleichzeitig auch nur einen minimalen Sauerstoffbedarf aufweisen. (19)

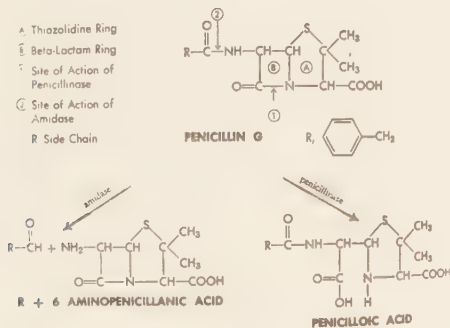
Alle Erreger, die für ihre Lebensfähigkeit Glutaminsäure benötigen, sind PENICILLIN-empfindlich. (19) PENICILLIN ist ein Inhibitor der Glutaminsäure-Assimilation. (20) PENICILLIN verhindert den Transport von Nährstoffen in das Zellinnere, nicht aber die Verwertung der sich bereits intrazellulär deponierten Glutaminsäure für den Proteinaufbau. (21-29)

Die Hauptwirkung des PENICILLINS wird von vielen Autoren in einer Hemmung der Mitose gesehen. (30) Die Zunahme der bakteriellen Resistenz gegen Antibiotika ist ein Bestandteil der Evolution überhaupt. (31) Durch den Kontakt des PENICILLINS könnten endogene toxische Produkte entstehen, die für die toxischen Erscheinungen verantwortlich zu machen wären. (32)

Die bakterizide Wirkung des PENICILLINS ist ein langsamer Prozeß, der sich über viele Stunden erstreckt. Empfindliche Mikroorganismen, geschädigt durch PENICILLIN, in

ein Antibiotika-freies Medium verbracht, vermehren sich nicht sofort wieder, sondern der nachfolgende Effekt der Zytotoxizität hält noch mehrere Stunden an. (33, 35, 37) Andere Agentien vermögen die Sensitivität des Staph. aureus für PENICILLIN zu verändern. Eine Tatsache, die hinsichtlich auch der Reaktion in vitro, zu beachten sein wird. (34) PENICILLIN soll in der Lage sein, die gesamten Enzymsysteme der Ribonuclease, der Mononucleotidase und der Phosphatase zu hemmen und damit den Stoffwechsel entscheidend zu unterbrechen. (36 und 36a)

Die Antibiotikawirkung des PENICILLINS auf Nucleinsäure und Protein-Synthese beim Staphylococcus aureus wurde gründlich untersucht. (38) Die eventuelle Inhibition resultiert aus einem allgemeinen metabolischen Prozeß, z.B. durch die Wirkung eines Enzymes oder durch einen unbedingt notwendigen Effekt auf eine enzymatische Reaktion. (39, 40, 41)



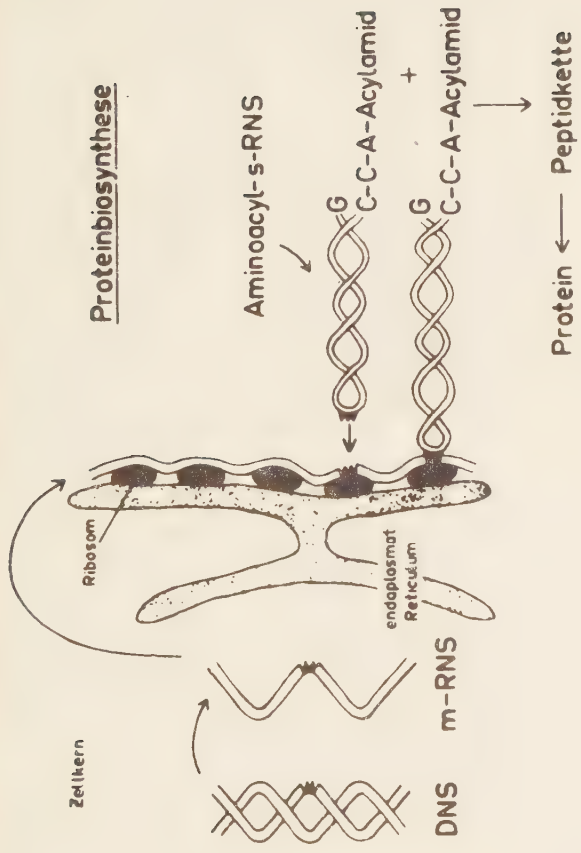
F.2. Schema der enzymatischen Hydrolyse des PENICILLINS.  
 Aus I.S. GOODMAN and A. GILMAN: The pharmacological basis of therapeutics, 4<sup>th</sup> Ed. Macmillan Comp.  
 London, 1970.

Die zytochemischen Mechanismen der PENICILLIN-Wirkung konnten durch Untersuchungen mit Derivaten der Ribonukleinsäure aufgedeckt werden. (42) Ähnliche Untersuchungen über die biochemischen Mechanismen der Antibiotika-Wirkung insgesamt und ihre spezielle Aktivität ergaben weitere Ergebnisse. (43) Das Gleichgewicht zwischen Nucleotiden und Nucleinsäuren wird durch die PENICILLIN-Wirkung empfindlich gestört (44, 45), das energieliefernde Prinzip der Dephosphorylierung und die energetische Utilisation von Gluziden durch Bakterien in Gegenwart von PENICILLIN (46).

Der Wirkungsmechanismus des PENICILLIN wird wie folgt vorgestellt: Das Antibiotikum blockiert den letzten Schritt der Murein-Biosynthese, nämlich die Quervernetzung der N-Acetylglucosamin-Muraminsäure-Pentapeptid-Ketten (48). Die für diese Reaktion benötigte Transpeptidase wird von PENICILLIN durch Bindung der Transfer-Seite der Transpeptidase an das Carboxyl des  $\beta$ -Lactamringes alkyliert, wobei der  $\beta$ -Lactamring gesprengt wird (47). Durch die Bildung eines Antibiotika-Enzym-Komplexes ist das Ferment für die eigentliche Transpeptidierungsreaktion inaktiviert und die Synthese des Mureins = die Bereitstellung neuen Zellwandmaterials unterbunden (49). Daher schreitet die Hydrolyse auf Grund der Störung des Enzymgleichgewichts zwischen Hydrolasen und Synthetasen fort (siehe F.2.). Die Folge ist eine Selbstvernichtung der Bakterienzelle (50-55).

#### Die Aminoglykosid-Antibiotika

Die Aminoglykosid-Antibiotika gehören zu den Inhibitoren der Protein-Synthese (56). Bei den durch STREPTOMYCIN (STRM) und den anderen Aminoglykosid-Antibiotika (AGS) eingeleiteten Prozessen verlaufen die Reaktionen an den Ribonucleoprotein-Partikeln der Zelle, den Ribosomen. Die funktionelle Einheit der Protein-Synthese ist das 70 S-Ribosom. (57,58,59) F.3/1 und 3/2. (Siehe S.11,12)



Proteinbiosynthese

F.3/1. Schema der Protein-Biosynthese

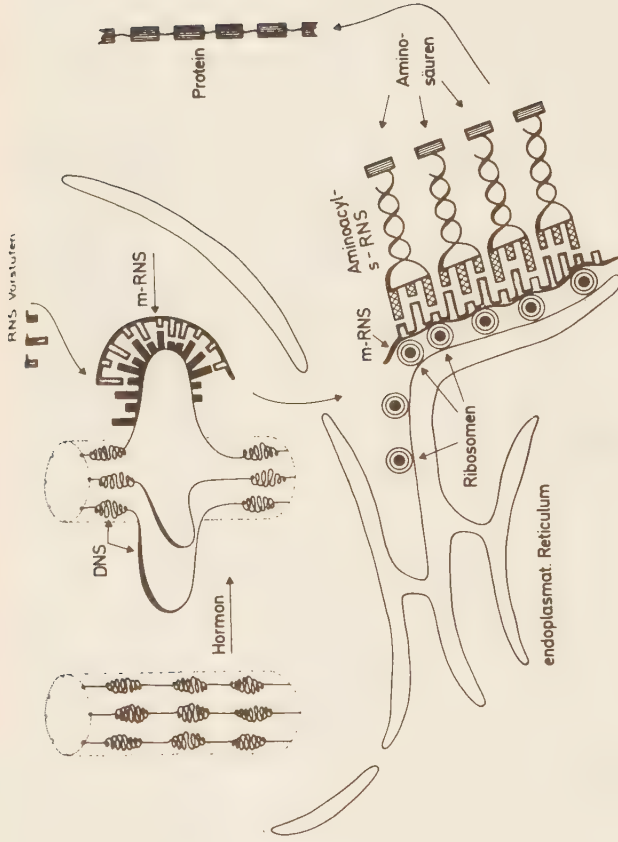
Aus: R. RIEMSCHEIDER: Material für Biochemische

Einführungs-Vorlesungen

Freie Universität Berlin, 1969, S. 44

Institut für Biochemie





F.3/2.

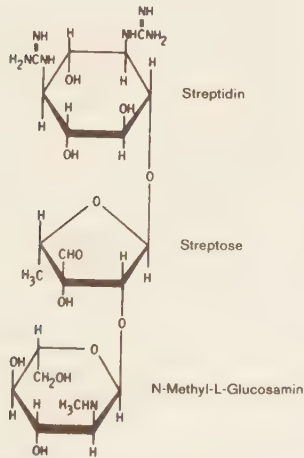
Protein-Biosynthese 2

Aus: R. RIEMSCHNEIDER:

Material für Biochemische  
Einführungs-Vorlesungen

Freie Universität Berlin, 1969, S. 45  
Institut für Biochemie

Zu den AGS-Antibiotika gehören STREPTOMYCIN (STRM), KANAMYCIN (KM), NEOMYCIN (NM) und GENTAMYCIN (GM). Ihre Reaktionen und Mechanismen entsprechen im allgemeinen dem Prototyp des STRM. F. 4 und 5.



#### F.4. STREPTOMYCIN

Aus T.J. FRANKLIN and G.A. SNOW: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1973



F.5. Struktur-Formeln von zwei weiteren  
Aminoglycosid-Antibiotika

Aus T.J. FRANKLIN and G.A. SNOW: Biochemie  
antimikrobieller Wirkstoffe,  
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York,  
1973

Die Anwendung an lebenden Zellen (60) legt Mechanismen klar, die ihre Bedeutung in der Zerstörung der Zellmembran besitzen. (61) Würden E.coli-Zellen der Einwirkung von STRM ausgesetzt, so werden als Reaktion auf das Antibiotikum beträchtliche Mengen von Zellbestandteilen, die als Adenosin-guanosin-phosphat identifiziert wurden, ausgestoßen. (62)

Die Aufnahme des Antibiotikums scheint von der fortlaufenden Synthese der Zellwand abzuhängen. (63)

Umweltbedingungen, die das Wachstum und die bakterizide Aktion verhindern,

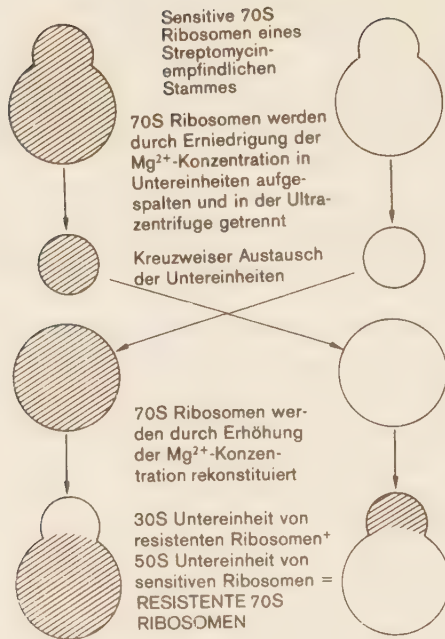
vermindern dadurch die Aufnahme des Antibiotikums. (64)

Der primäre Aktionsbereich des STRM ist die Bakterien-Zellmembran. (65) Einer kurzen, initialen Adsorption an der Oberfläche folgte eine sekundäre und längere Periode der Aufnahme. (66) Nach weiteren Untersuchungen wurde klar, daß STRM die Fähigkeit besitzt, sich in die Proteinsynthese (67), und dort in die zellfreien Systeme der Ribosomen, einzumischen. (68)

An Zellen eines STRM-sensitiven Stammes von E.coli vermindert STRM die Phenylalanin- $C^{14}$ -Aufnahme in das Protein. (68) Die Proteinsynthese wird in einem zellfreien System von Diplococcus pneumonia ebenfalls inhibiert. (69)

Die Abtötungsrate des STRM hängt von der Kapazität der Zellen für die Proteinsynthese ab und von der Applikationszeit. (70)

Es erscheint möglich, daß ein ribosomaler Locus, vermutlich auf der 30 S Untereinheit erst befreit sein muß, bevor eine neue STRM-Befestigung angeheftet werden kann, indem es die inaktivierten Ribosomen und seinen Messenger-RNA-Locus erreicht und damit die Aktion aller anderen Ribosomen verhindert, die später am Polysomen-Komplex angelagert würden. (71) Wiederholungen durch diese Art der Darstellung, vorwiegend zitierte wissenschaftliche Ergebnisse, lassen sich nicht ganz ausschließen.



#### F.6. 30 S-Untereinheit des Ribosoms

Aus T.J. FRANKLIN and G.A. SNOW: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe  
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1973

Der Effekt des STRM auf die Proteinsynthese ermöglicht eine ausgedehnte "misreading" des Polynucleotid-Codes. (71) In Gegenwart von STRM wird die normale Inkorporation von Phenylalanin, durch Polyuridilat gelenkt, um 50-70 % eingeschränkt, während die Inkorporation von Isoleucin, Leucin und Serin stimuliert wurde. KANAMYCIN und NEOMYCIN bringen ähnliche Effekte hervor. (72) Für STRM wird



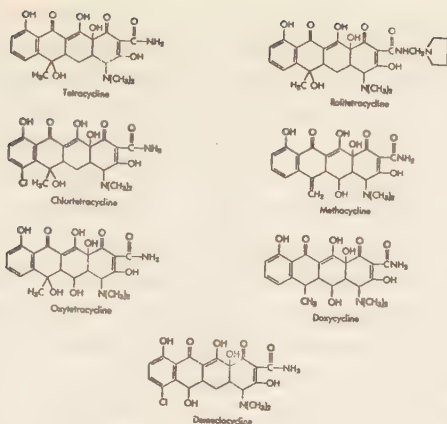
folgende Reaktion bei Bakterien angenommen: Das Antibiotikum hemmt die Aktion der Aminosäuren von dem Transfer-RNA-Aminosäure-Komplex in die Polypeptid-Ketten des Proteins hinein. (73) STRM, das an die 30 S-Untereinheit der Ribosomen angelagert wird, führt durch Verfälschung des genetischen Codes zur Synthese funktionsuntüchtiger Proteine. (74) s. F.6

Vom STRM und seinen Dihydroderivaten ist bekannt, daß sie gegenüber einer Reihe von Enzymen sowohl Stimulierungs- als auch Inhibierungs-Effekte verursachen. STRM und seine Dihydroderivate sind deutliche Inhibitoren der Proteinsynthese in intakten Bakterien, (75) und in zellfreien Systemen der Polypeptidsynthese. Nicht das gesamte 70 S-Ribosomen ist für die Wechselwirkung mit dem Antibiotikum verantwortlich, sondern die 30 S-Untereinheit spielt auch eine determinierende Rolle. (75) Eine falsche Translation eines natürlichen Messengers könnte man aus Versuchen über die Aminosäure-kontrollierte STRM-Wirkung an Säugetierzellen ableiten. (76) Hiernach kommt die STRM-Wirkung nur dann zustande, wenn die spezifische Aminosäure, die durch Fehlablesung in größerer Menge in ein abnormes Protein eingebaut wird, in der Zelle auch in genügender Menge zur Verfügung steht.

Neben den geschilderten Wirkungen des STRM und anderer Aminoglycosid-Antibiotika auf die Proteinsynthese existieren zahlreiche Befunde, die eine Beeinflussung des Nukleinsäure-Stoffwechsels nachweisen. Auch die hier vorgelegten Untersuchungen weisen in diese Richtung. -

Der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe findet in den Kapillaren statt. Nur etwa 0,14 % der Kapillarfläche ist für Wasser durchgängig. Der Stoffaustausch von wasserlöslichen Molekülen, und die Antibiotika sind alle wasserlöslich, erfolgt durch Diffusion und Filtration. Daneben vermögen zelluläre Proteine Pharmaka an sog. unspezifischen Bindungsstellen festzuhalten. Siehe F. 7.





#### F.8. Struktur-Formeln der TETRACYCLINE

Aus: L.S. GOODMAN and A. GILMAN: The pharmacological basis of therapeutics. 4<sup>th</sup> Ed. Macmillan Comp. London, Toronto, 1970

Die Effekte der TC auf den Aminosäure-Metabolismus erscheinen komplex. In Gegenwart des Antibiotikums sinkt die intrazelluläre Konzentration der Aminosäuren, außer bei Alanin und Glutaminsäure, wogegen einige andere Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin vollständig verschwinden. (80) Diese Beobachtungen können durch Be-  
richte erklärt werden, die aufzeigen, daß TC sich bei der D-Glutaminsäure-Inkorporation einmischt, (81), z.B. in die Produktion der 5-Dehydroshikimie-Säure, einen Vorläufer der aromatischen Aminosäuren. (82)

Ein weiterer interessanter Aspekt der TC ist ihre Eigen-  
schaft mit zweiwertigen Metallionen Chelate zu bilden und werden durch deren Vermittlung an Proteine bzw. DNA gebunden. (83) Die Chelate wurden durch Farbbildung in den Kulturen festgestellt. Die spezifische Toxizität des Oxytetracyclins bleibt den Salzen  $Fe^{+++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$

und  $\text{MoO}_4$  vorbehalten. (84) Auch eine andere Möglichkeit soll hier noch aufgereizt werden, daß nämlich eine Brücke von Metall-Atomen für die Bindung des TC an den Rezeptorlocus notwendig ist. Die TC wirken wahrscheinlich vorwiegend auf den Mechanismus der Proteinsynthese und auf den oxydativen Stoffwechsel bzw. die Mitochondrien. (85) Die Möglichkeit, daß TC die Proteinsynthese durch Verhinderung der Assoziation der tRNA mit den Ribosomen verhindert, wurde in Untersuchungen bestätigt. (86), und ihre Bindung an Ribosomen von Rattenlebern bewiesen. (87) Die Unterbindung des Aminosäure-Transfers durch TC wurde ebenfalls bestätigt. (88) Chlortetracyclin, Oxytetracyclin inhibieren den Transfer der Aminosäuren zum ribosomalen Protein. (88) Aus allen diesen Publikationen darf gefolgert werden, daß der wichtigste Inhibitor-Effekt der TETRACYCLINE, wenn sie bei bakteriostatischen Konzentrationen getestet werden, nur die Inhibition der Protein-Biosynthese war. (89-93) Neuere Untersuchungen berichteten von der Aktivität der TC am Bakterien-Ribosom, um die Proteinsynthese zu hemmen. So wird versucht, die sensitiven Reaktionen der TC genau zu identifizieren. TC blockieren bei den 70 S-Ribosomen eine der zwei Möglichkeiten der Aminoacyl-Transfer RNA. (94) Chlortetracyclin inhibiert die Bindung von Phenyl-alanyl-Transfer-RNA an die Ribosomen. (95) Die Proteinsynthese nimmt ihren Ausgang in wachsende Bakterien von den Polysomen, die auf den Ribosomen angehäuft sind, und durch deren Messenger-RNA zusammengehalten werden. (96) wir können davon ausgehen, daß entweder die Aminoacyl-Transfer-RNA-Bindung durch TC inhibiert wird oder auch an den Polysomen agieren kann. Die TETRACYCLIN-Gruppe stellt im Hinblick auf ihre Aktionsmechanismen und ihre multiplen Effekte mehr als nur eine inhibitorische Aktivität dar. (90) Die TC inhibieren die Proteinsynthese in intakten Bakterien (97) (98 und 99), in Zellfreien Systemen von Bakterien (100-104)

und in Säugetierzellen. (100, 104) Ribosomen, aus Rattenlebern isoliert, sind befähigt, bestimmte Mengen von TC zu binden. Die Menge der Bindung hängt von der TC-Konzentration und der Präsenz von Mg- und K-Ionen ab. Die größte gebundene Menge war 300 Moleküle TC pro Ribosom. (105)

Die TC agieren durch Interferenz mit dem Nukleinsäure-Metabolismus und der Proteinsynthese der Bakterien. (106) Die Interferenz der Proteinsynthese war der Modus, der von größter Bedeutung für den biologischen Mechanismus der TC wurde. (107) Die Inhibition der Proteinsynthese ist der primäre Effekt nach dem Auftreffen der TC auf die Bakterienzelle. (108) Die Proteinsynthese, essentiell für die DNA-Replikation, schreitet durch eine Serie von zwischengeschalteten Schritten weiter fort, bei denen spezifische Aminosäuren systematisch den Peptidketten zugeführt werden.

Untersuchungen über die Wirkung der TETRACYCLINE auf die Wechselbeziehungen zwischen tRNS und Ribosom zeigen, daß diese Antibiotika die Bindung der Aminoacyl-transfers-RNS an die Akzeptorstelle des Ribosoms hemmen. Die TETRACYCLINE hemmen offensichtlich die Peptidbindung nicht direkt. TETRACYCLIN hemmt tatsächlich die mRNS-gesteuerte Bindung von Aminoacyl-tRNS an isolierte 30 S-Partikel und an ganze Ribosomen (109)

Die TC dringen nicht nur in die extrazelluläre Flüssigkeit der Organe ein, sondern auch in das Innere der Zellen. Das wurde für die Leukozyten (110), die Makrophagen (111) und die Erythrozyten gezeigt. (112)

Trotz der großen praktischen Bedeutung dieser Probleme sind kaum Angaben bekannt, über die Möglichkeiten in die infolge einer Infektion entzündlich veränderten menschlichen Gewebe zu penetrieren (s.F.7). TC und OTC scheinen im menschlichen Organismus wenig oder gar nicht abgebaut zu werden. Es ist wahrscheinlich, daß der Hauptteil der nicht im Urin oder den Faeces ausgeschiedenen Fraktionen



im Organismus in bakteriologisch unwirksame Derivate, entweder durch chemische Transformation oder Chelatbildung, umgewandelt wird. (113)

Der molekulare Mechanismus der TETRACYCLIN-Wirkung, Hemmung von Bakterien, besteht in einer Inhibition der Protein-Synthese und möglicherweise Störungen der Aminosäure-Übertragung von Amino-acyl-t RNA auf Ribosomenproteine. (114)

Antibiotika, wie die TETRACYCLINE, haben eine bakteriostatische Wirkung. Sie stoppen das Bakterienwachstum, töten die Bakterien aber nicht ab. Andere Agentien, wie PENICILLIN, STREPTOMYCIN, KANAMYCIN und NEOMYCIN haben eine bakterizide Wirkung, sie töten Bakterien. Diese bakterizide Wirkung benötigt eine Proliferation der Mikroorganismen. Daher dürften die hier angeführten Untersuchungen auch ein Ausdruck einer bakteriostatischen oder einer übertragenen bakteriziden Wirkung der Antibiotika sein. (115)

TETRACYCLINE inhibieren die Bindung von AA-tRNA (Amino-acyl-tRNA) an die A-Seite des Ribosoms in vitro und in vivo. Bei niedrigen TETRACYCLIN-Konzentrationen vermindert sich die Zahl der Polysomen, bei höheren Konzentrationen vergrößern sich die Polysomen. Dies kann eine Konsequenz für die Fähigkeit der TETRACYCLINE sein, sowohl die Termination als auch die AA-tRNA-Bindung an das Ribosom zu inhibieren. Noch größere Konzentrationen lösen dann andere Effekte aus: Inhibition der Initiation und von an Peptide-gebundene Formationen. Vorwiegend werden TETRACYCLINE an der 30 S - Unterheinheit gebunden. (116)

Die Tatsache der ausführlichen Beschreibung der Wirkungsmechanismen der verwendeten Antibiotika läßt hinsichtlich der angewandten therapeutischen Menge eine Aussage über toxische Effekte auf die Proteinbiosynthese zu.

Literaturverzeichnis : Biochemische Mechanismen der

Antibiotika-Wirkung

- L.WEINSTEIN : General considerations.  
Chemotherapy of microbial diseases.  
Chapter 55, Sect. XIV. pp. 1154-1176  
in L.S.GOODMAN and A.GILMAN :  
The Pharmacological Basis of  
Therapeutics, Fourth Edition, 1970
- (1) HASH, J.H. : Antibiotic mechanisms.  
Ann. Rev. Pharmacol. 12, 35-56 (1972)
- (2) BADDILEY, J. : Teichoic acids and the molecular  
structure of bacterial walls.  
Proc. Roy. Soc. B. 170, 331 (1968)
- (3) STROMINGER, J.L., Peptidoglycan transpeptidase and  
IZAKI, K., D-alanine carboxypeptidase :  
MATSUHASHI, M., Penicillin-sensitive enzymatic  
and TIPPER, D.J.: reactions. Fed. Proc. 26, 9-22 (1967)
- (4) PARK, J.T., Accumulation of labile phosphate  
and JOHNSON, M.J.: in Staphylococcus aureus grown  
in the presence of penicillin.  
J. Biol. Chem. 179, 585-592 (1949)
- (5) PARK, J.T. : Uridine-5-pyrophosphate derivatives.  
I. Isolation from Staphylococcus  
aureus. J. Biol. Chem. 194, 877-884 (1952)  
II. A structure common to three  
derivatives. J. Biol. Chem. 194, 885-895  
(1952)  
III. Amino acid-containing derivatives  
J. Biol. Chem. 194, 897-904 (1952)

- (6) PARK, J.T., Mode of action of penicillin.  
and STROMINGER, J.L. : Science 125, 99-101 (1957)
- (7) MURRAY, R.G.E., The effect of penicillin on  
FRANCOMBE, W.E., the structure of staphylo-  
MAYALL, R.H. : coccocal cell walls,  
Can. J. Microbiol. 5, 641-648 (1959)
- (8) COOPER, P.D. : The site action of radio-  
penicillin. Bact. Rev. 20, 28-48  
(1956)
- (9) CHAIN, E. Bactericidal and bacteriolytic  
and DUTHIE, E.S. : action of penicillin on the  
staphylococcus. Lancet 248,  
652-657 (1945)
- (10) FRIEDEN, E.H. The effect of various agents  
and FRAZIER, Ch.N. : upon the sensitivity of Staph.  
aureus to penicillin.  
Arch. Biochem. 15, 265-278 (1947)
- (11) TIETZ, E. : Med. Dissertation. Tübingen, 1949
- (12) PRATT, R. Cytochemical mechanisms of  
and DUFRENOY, J. : penicillin action. II. Changes  
in reactions of Staph. aureus  
to vital dyes. J. Bacter. 54,  
127-133 (1947)
- III. Effect on reaction to the  
gram stain in Staph. aureus.  
J. Bacter. 54, 283-289 (1947)
- VIII. Involvement of ribosomic  
acid derivatives. J. Bacter. 57,  
9-13 (1949)

- (13) GARDNER, A.D. : Morphological effects of penicillin on bacteria. Nature (Ld.) 146, 837 (1940)
- (14) MAAS, E.A., Penicillin uptake by bacterial  
and JOHNSON, M.J.: cells. J. Bacteriol. 57, 415-422 (1949)
- (15) GOLDBERG, H.S. : Antibiotics.  
Their chemistry and non-medical use.  
D. van Nostrand Comp. Inc. Princeton,  
1959
- (16) KNOX, R. : Effect of penicillin on cultures in  
liquid and solid media. Lancet 248,  
559-561 (1945)
- (17) WEIDEL, W. Die gemeinsame Wurzel der Lyse von  
und PRIMOSIGH, J.: E. coli durch Penicillin oder durch  
Phagen. Z. Naturforsch. 12b, 421-427  
(1957)
- (18) WEIDEL, W. Biochemical parallels between lysis  
und PRIMOSIGH, J.: by virulent phage and lysis by  
penicillin. J. gen. Microbiol. 18, 513-  
517 (1958)
- (19) GALE, E.F. The action of penicillin in preven-  
and TAYLOR, E.S. : ting the assimilation of glutamic  
acid by Staphylococcus aureus.  
Nature (Ld.) 158, 676-678 (1946)
- (20) Pratt, R. Antibiotics.  
and DUFRENOY, J. : Lipincott, Philadelphia, p. 135, 1949
- (21) GALE, E.F. : Correlation between penicillin resi-  
stance and assimilation affinity in  
Staphylococcus aureus. Nature (Ld.)  
160, 407-408 (1947)

- (22) GALE,E.F.                      The action of penicillin in  
and TAYLOR,E.S.                : preventing the assimilation  
                                 of glutamic acid by Staphylo-  
                                 coccus aureus. Nature (Ld.)  
                                 158,676-678 (1946)
- (23) GALE,E.F.                      The assimilation of amino acids  
and PAINE,T.F.                : by bacteria. Biochem.J.48,  
                                 298-301 (1951)
- (24) GALE,E.F.                      : The nature of the selective .  
                                 toxicity of antibiotics.  
                                 Brit.Med.Bull.16,11-15 (1960)
- (25) GALE,E.F.                      : Mechanism of antibiotic action.  
                                 Pharmacol.Rev.15,481-530 (1963)
- (26) GALE,E.F.                      The action of penicillin in  
and TAYLOR,E.S.                : preventing the assimilation  
                                 of glutamic acid by Staphylo-  
                                 coccus aureus. Nature (Ld.)  
                                 158,676-678 (1946)
- (27) GALE,E.F.                      The assimilation of amino acids  
and TAYLOR,E.S.                : by bacteria.V. The action of  
                                 penicillin in preventing the  
                                 assimilation of glutamic acid  
                                 by Staphylococcus aureus.  
                                 J.gen.Microbiol.1,314 (1947)
- (28) MANDELSTAM,J.                The incorporation of amino  
and ROGERS,H.J.                : acids into the cell-wall muco-  
                                 peptide of Staphylococci and  
                                 the effect of antibiotics in  
                                 the process. Biochem.J.72,  
                                 654-662 (1959)
- (29) RAU-HUND,A.                    Die Wirkung von Penicillin auf  
und KANDLER,O.                : den Eiweißstoffwechsel von



- (30) CHAIN, E. : Chemistry and Biochemistry of Antibiotics. Ann. Rev. Biochem. 27, 167-222 (1958)
- (31) EAGLE, H.,  
FLEISCHMAN, R.  
and LEVY, M. : Development of increased bacterial resistance to antibiotics. I. Continuous spectrum of resistance to penicillin, chloramphenicol and streptomycin. J. Bact. 63, 623-628 (1952)
- (32) GRIMME, H. : Experimentelle Untersuchungen zur Frage der toxischen Wirkungen des Penicillins. Arch. Derm. Syph. 201, 195 (1955)
- (33) EAGLE, H. : The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J. clin. invest. 28, 382-386 (1949)
- (34) FRIEDEN, E. H.  
and FRAZIER, Ch. N. : The effect of various agents upon the sensitivity of Staph. aureus to penicillin. Arch. Biochem. 15, 265-278 (1947)
- (35) EAGLE, H. : Experimental approach to the problem of treatment failure with penicillin. I. Group A staphylococcal infection in mice. Am. J. Med. 13, 389-399 (1952)
- (36) HOBBY, G. L.  
and DAWSON, M. H. : Bacteriostatic action of penicillin on hemolytic streptococci in vitro. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 56, 178-181 (1944)
- Effect of rate of growth of bacteria on action of penicillin. ibid 56, 181-184, (1944)

- (37) EAGLE, H. : The bactericidal action of penicillin in vivo : In participation of the host, and the slow recovery of the surviving organism. Ann. intern. Med. 33, 544-571 (1950)
- (38) GALE, E. F. Actions of antibiotics on nucleic acids and FOLKES, J. P. : acids and protein synthesis in Staph. aureus, Biochem. J. 53, 493-498 (1953)
- (39) GEORGE, M. Sensitisation of penicillin-resistant and PANDALAI, K. M. : stant pathogens. Lancet 256, 955 - 957 (1949)
- (40) KRAMPFITZ, L. O. Arch. Biochem. 12, 57 (1947) citiert and WERKMAN, C. H. : bei JANOT, M. M. et KEUFER, J. : Mécanismes Biochimiques de l'activité des antibiotiques, Masson et Cie. Paris, 1953
- (41) PANDALAI, K. M. A possible mode of action of penicillin. Brit. Med. J. 1947, II, 210-211 and GEORGE, M. :
- (42) PRATT, R. Cytochemical mechanisms of penicillin action. VIII. Involvement of ribonucleic acid derivatives. J. Bacteriol. 57, 9-13 (1949) and DUFFRENCY, J. :
- (43) JANOT, M. M. Mécanismes Biochimiques de l'activité des antibiotiques. Masson et Cie., Paris, 1953 et KEUFER, J. :
- (44) MITCHELL, P. : Some observations on the mode of action of penicillin. Nature (Id.) 164, 259-262 (1949)

- (45) MITCHELL, P.  
and MOYLE, J. : Occurence of a phosphoric ester in certain bacteria : Its relation to gram staining and penicillin. Nature (Ld.) 166, 218-220 (1950)
- (46) GROS, F.,  
MACHEBOEUF, M.  
et LACALLE, P. : Action des antibiotiques sur le metabolisme prolidique chez les bactéries. I. Recherches sur le catabolisme de protéines et des peptides. Ann. l'Inst. Pasteur 75/4, 320-328 (1948)
- (47) TIPPER, J. D.  
and STROMINGER, J. L. : Mechanism of action of penicillins : A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 1133-1141, (1965)
- (48) UMBREIT, W. W. : Mechanisms of antibacterial action. Pharmacol. Rev. 5, 275-284 (1953)
- (49) BÄR, H.  
und ZARNACK, J. : Molekularbiologische Grundlagen des Wirkungsmechanismus der Penicilline und Cephalosporine. Pharmazie 25. Jg. 10-22 (1970)
- (50) MITCHELL, P.  
and MOYLE, J. : Autolytic release and osmotic properties of " protoplasts " from Staph. aureus. J. gen. Microbiol. 16, 184-194 (1957)
- (51) STRANGE, R. E.  
and DARK, F. A. : A cell-wall lytic enzyme associated with spores of Bacillus species. J. gen. Microbiol. 16, 236-249 (1957)

- (52) STROMINGER, J.L. : Microbial uridine-5-pyrophosphate N-acetyl-amine sugar compounds. I. Biology of the penicillin-induced accumulation.  
J.Biol.Chem.224,509-523 (1957)
- (53) STROMINGER, J.L. Peptidoglycan transpeptidase  
IZAKI, K. and D-alanine carboxypeptidase : Penicillin-sensitive  
MATSUHASHI, M. and TIPPER, D.J. : reactions. Fed.Proc.Am.Soc.  
exp.Biol.26,9-22 (1967)
- (54) WEIDEL, W. : Ein neuer Typ von Makromolekülen. Angew.Chem.76, 801-807 (1964)
- (55) WEIDEL, W. : The rigid layer of the cell-wall of E.coli strain B.  
FRANK, H. J.gen.Microbiol.22,158-166  
And MARTIN, H.H. (1960)
- (56) BURCHALL, J.J. Antibacterial Chemotherapy.  
FERRONE, R. Ann.Rev.Pharmacol.5,53-76  
and HITCHINGS, G.H. : (1965)
- (57) WEISBLUM, B. Antibiotic inhibitors of the  
and DAVIES, J. : bacterial ribosomes.  
Bacteriol.Rev.32,493-528 (1968)
- (58) DAVIES, B.D. : Use of antibiotics in the study of ribosome action.  
Antimicrob.Ag.Chemother. 9,11-17 (1969)

- (59) SCHLESSINGER, D. : Ribosomes : Development of some current ideas.  
Bacteriol.Rev.33,445-453 (1969)
- (60) DAVIES, B.D. The Bacteria.IV.p.343-397  
and FEINGOLD, D.S. : Academic Press New York, 1962
- (61) HURWITZ, C. : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p.371, (1963)  
Academic Press New York
- (62) ROTH, H. Purine nucleotide excretion  
AMOS, H. by E.coli in the presence of  
and DAVIS, B.D. : Streptomycin. Biochim.Biophys.  
Acta 37,398-405 (1960)
- (63) HANCOCK, R. : The bactericidal action of streptomycin on Staph.aureus and some accompanying changes.  
J.gen.Microbiol.23,179-196 (1962)
- (64) HANCOCK, R. : Uptake of  $^{14}\text{C}$ -streptomycin by Bacillus megaterium.  
J.gen.Microbiol.28,503-516, (1962)
- (65) ANAND, N. Effect of Streptomycin on  
DAVIS, B.D. Escherichia coli.Uptake of  
and ARMITAGE, A.K. : streptomycin by E.coli.  
Nature (Ld.) 185,22-24 (1960)
- (66) FITZGERALD, R.J. The inhibition of streptomycin  
BERNHEIM, F. of adaptive enzyme formation  
and FITZGERALD, D.B. : in mycobacteria.  
J.Biol.Chem.175,195-200 (1948)

- (67) FLASKS, J.G.                      Inhibition of polypeptide syn-  
COX, E.C.                              thesis by streptomycin.  
and WHITE, J.R.                      : Biochem. Biophys. Res. Commun.  
7, 385-389 (1962)
- (68) SPEYER, J.F.                      Ribosomal localization of  
LENGYEL, P.                              streptomycin sensitivity.  
and BASILIO, C.                      : Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 684  
- 686 (1962)
- (69) SAWADA, F.                          Streptomycin-sensitive and  
and SUZUKI, K.                          : resistant ribosomes of  
Diplococcus pneumoniae.  
Biochim. Biophys. Acta 80, 160  
- 163 (1964)
- (70) COX, E.C.                              Streptomycin action and the  
WHITE, J.R.                              ribosome. Proc. Nat. Acad. Sci.  
and FLASKS, J.G.                      : USA 51, 703-709 (1964)
- (71) BURCHALL, J.J.                      Antibacterial Chemotherapy.  
FERONE, R.                              Ann. Rev. Pharmacol. 5, 53-76  
and HITCHINGS, G.H.                      : (1965)
- (72) DAVIES, J.                              Streptomycin, suppression and  
and GILBERT, W.                          : the code. Proc. Nat. Acad. Sci.  
USA, 51, 883-890 (1964)
- (73) DUBIN, D.T.                          : Some effects of streptomycin  
on RNA metabolism in Escheri-  
chia coli. J. Mol. Biol. 8, 749  
- 767 (1964)
- (74) WAGNER, G.                              : Zur Problematik der Nukleosid-  
antimetabolite. Pharmazie 26.  
Jg. 377-387 (1971)



- (75) SCHMIDT, H. Über die Chemie und die bio-  
SYCH, F. J. chemischen Wirkungsmechanismen  
und GOSDA, W. : des Streptomycins.  
Pharmazie 23. Jg. 161-173 (1968)
- (76) MOSKOWITZ, M. Amino acid control of strepto-  
and KELKER, N. : mycin action on mammalian cells  
Nature 205, 476-477 (1965)
- (77) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharma-  
kologischer Wirkung.  
F. K. Schattauer-Verlag, Stuttgart  
New York, 1971
- (78) GIBSON, F. Effect of antibiotics on  
JONES, M. J. indole synthesis by Escherichia  
and TELTSCHER, H. : coli. Nature (Ld.) 176, 164+  
(1955)
- (79) HASE, J. H. On the mode of action of the  
WISHNICK, M. tetracycline antibiotics in  
and MILLER, P. A. : Staphylococcus aureus.  
J. Biol. Chem. 239, 2070-2078  
(1964)
- (80) FREEMAN, B. Effect of tetracyclines on the  
and CIRCO, R. : intracellular amino acids of  
J. Bacteriol. 86, 38-44 (1963)
- (81) CHENG, L. Studies in metabolic spectra.  
and SNELL, J. F. : IV. Effects of tetracyclines,  
some of their derivatives, and  
chloramphenicol on accumulation  
of glutamic acid in E. coli.  
J. Bacteriol. 83, 711-719 (1962)

- (82) GIBSON, F.                      The effect of chloramphenicol  
and McDOUGALL, B. : and oxytetracycline on the forma-  
tion of intermediates in trypto-  
phan biosynthesis.  
Austral.J.Exp.Biol.Med.Sci.39,  
171-178 (1961)
- (83) OXFORD, A.E.                : A colorimetric method, metallic  
complex formation, for the detec-  
tion of Aureomycin in presence  
of amino acids and proteins.  
Nature (Ld.) 172, 394-395 (1953)
- (84) WEINBERG, E.D.            : The influence of inorganic salts  
on the activity in vitro of  
oxytetracycline. Antibiot. Chemo-  
ther.4, 35-42 (1954)
- (85) DuBUY, H.G.                Selective localization of tetra-  
and SHOWACRE, J.L. : cycline in mitochondria of  
living cells. Science 133, 196-  
197 (1961)
- (86) MAXWELL, I.H.            : Partial removal of bound trans-  
fer RNA from polysomes engaged  
in protein synthesis in vitro  
after addition of tetracycline.  
Biochem.Biophys.Acta 138, 337-346  
(1967)
- (87) MAXWELL, I.H.            : Studies of the binding of tetra-  
cyclines to ribosome in vitro.  
Mol.Pharmacol.4, 25-37 (1968)
- (88) COOPER, J.R.              : Biochemical mechanism of drug  
action. Ann.Rev.Pharmacol.4,  
1-20 (1964)

- (89) FRANKLIN, T. J. : Mode of action of the tetracyclines in biochemical studies of antimicrobial drugs. Symposium of the Society of General Microbiology, vol. 16, pp. 192-212 (Cambridge University Press, London, 1966)
- (90) LASLIN, A. I. : Tetracyclines. in GOTTLIEB, D. and SHAW, P. D.: Antibiotics, vol. I, Mechanism of action, pp. 331-359 and 752-754, Springer, Berlin, 1967
- (91) LASKIN, A. I. : Molecular aspects of tetracycline activity. Proc. of the 6th Int. Congr. Chemotherapy Tokyo, 1969, pp. 441-444, University of Tokyo Press, Tokyo, 1970
- (92) WEISBLUM, H. and DAVIES, J. : Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosomes. Bact. Rev. 32, 493-528 (1968)
- (93) LENGYEL, P. and SÖLL, D. : Mechanism of protein biosynthesis. Bact. Rev. 33, 264-301 (1969)
- (94) SUAREZ, G. and NATHANS, D. : RNA-binding to ribosomes by tetracyclines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 743-750 (1965)
- (95) LUCAS-LENARD, J. and HAENNI, A. L. : Requirement of guanosine-5-triphosphate for ribosomal binding to aminoacyl-sRNA. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 59, 554-560 (1968)

- (96) MODOLEU, J. Mechanism of inhibition of  
and DAVIS, B.D. : ribosomes by streptomycin.  
Nature (Ld.) 224, 345-348 (1969)
- (97) GALE, E.F. The assimilation of amino acids  
and FOLKES, J.P. : by bacteria. Actions of anti-  
biotics on nucleic acid and  
protein synthesis in Staph.  
aureus. Biochem. J. 53, 483-498  
(1953)
- (98) HASH, J.H. On the mode of action of the  
WISHNICK, M. tetracycline antibiotics in  
and MILLER, P.A. : Staphylococcus aureus. J. Biol.  
Chem. 239, 2070-2078 (1964)
- (99) HARTMANN, G. Antibiotica als Hemmstoffe  
BEHR, W. der Nucleinsäure- und Pro-  
BEISSNER, K.A. teinbiosynthese.  
HONIKEL, K. Angew. Chem. 80, 710 (1968)  
und SIPPEL, A. :
- (100) FRANKLIN, T.J. : The inhibition of incorpora-  
tion of leucine into protein  
of cell-free systems from rat  
liver and Escherichia coli by  
chlortetracycline. Biochem. J.  
87, 449-453 (1963)
- (101) LASKIN, A.I. Inhibition by tetracyclines of  
and CHAN, W.M. : polyuridylic acid directed  
phenylalanine incorporation in  
Escherichia coli cell free  
systems. Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 14, 137-142 (1964)

- (102) OKAMOTO,S. Mechanism of chloramphenicol  
and MIZUNO,D. : and Tetracycline resistance in  
Escherichia coli. J.Gen.Micro-  
biol.35,125-133 (1964)
- (103) RENDI,R. Enzyme specificity in activa-  
and OCHOA,S. : tion and transfer of amino  
acids to ribonucleicprotein  
particles. Science 133,1367 +  
(1961)
- (104) CLARK,J.M. Inhibitors of the transfer of  
and CHANG,A.Y. : amino acids from aminoacyl so-  
luble ribonucleic acid to pro-  
teins. J.Biol.Chem.240,4734  
- 4739 (1965)
- (105) MAXWELL,I.H. : Studies of the binding of tetra-  
cycline to ribosomes in vitro.  
Mol.Pharmacol.4,25-37 (1968)
- (106) GALE,E.F. Effect of inhibitors and anti-  
and PAINE,T.F. : biotics on glutamic acid accu-  
mulation and on protein syn-  
thesis in Staph.aureus.  
Biochem.J.47,26 + (1950)
- (107) LASKIN,A.I. : Tetracyclines.  
In : Antibiotics I,Mechanism of  
Action.GOTTLLIEB,D.and SHAW,P.D.  
Springer Verlag,New York,1967
- (108) SWENSON,R.M. Clinical implication of the  
and SANDFORD,J.P. : mechanism of action of anti-  
microbial agents. Adv.Intern.  
Med.16,373-399 (1970)
- (109) FRANKLIN,T.J. Biochemie antimikrobieller Wirk-  
and SNOW,G.A. : stoffe.Springer-Verlag,Berlin,  
Heidelberg,New York,1973





## Ergebnisse experimenteller Untersuchungen

Es war das Ziel der im folgenden geschilderten Untersuchungen, an Gewebekulturen die Wirkungen der Antibiotika auf explantierte Gewebe in Zellen in vitro zu prüfen. Hierzu bedarf es einer spezifischen Explantations- und Implantations-Technik zur Gewinnung der Gewebe und ihrer Kultivierung.

### Material und Methodik

#### Kultur "im hängenden Tropfen".

Zu den Experimenten wurden sämtliche apothelialen und epithelialen Gewebe von 8-9 und 12 Tage alten Hühnerembryonen unter sterilen Kautelen lege artis explantiert und vermittels der Deckglaskultur-Methode "im hängenden Tropfen" kultiviert. Abb. 1. Hühnchen, 8-9 Tage bebrütet.

Die Technik der Kultur von Geweben "im hängenden Tropfen".

Diese Methode wurde zuerst von HARRISON (1907 und 1910), CARREL u. BURROWS (1910) und LEWIS (1911) kreiert.

Die zurechtgeschnittenen Explantate von embryonalen Hühnern werden mit Hilfe einer Platinöse oder eines Starmessers auf die Glasplättchen (24 x 32 mm) gebracht, die eng nebeneinanderliegend mit einer großen Glasglocke überdeckt sind. In die Mitte jedes Plättchens plaziert man 1 Tropfen Hühnerplasma (HP). Dort hinein kommt ein Gewebefragment, dazu wird jetzt 1 Tropfen Hühner-Embryonal-Extrakt (EE) hinzugefügt und das Ganze mit einer Platinöse oder einem sterilen Starmesser umgerührt. Dabei soll die vom Medium berührte Fläche etwa 2 mm kleiner sein als die hohlgeschliffene Öffnung des Objektträgers. Bindegewebsfragmente, wie Kardialmuskel oder Koronargefäße werden im Medium, Epithelfragmente auf der Oberfläche des geronnenen Plasma-Klotzes kultiviert. Danach werden

die Kulturen mit einem hohlgeschliffenen Objektträger, nachdem man rechts und links neben den Hohlschliff eine Spur Vaseline gegeben hat. Das Gewebsfragment paßt mit dem Medium genau in den Hohlschliff. Mit verflüssigtem Paraffin werden die Kulturen von der Außenluft abgeschlossen. Nach dem Abschließen, Nummerieren und der Eintragung im Protokollheft werden die Kulturen bei 37°C im Thermostaten kultiviert.

Die Konstanterhaltung physikalischer und chemischer Lebensbedingungen ist eine der Hauptaufgaben der Gewebekultur. Die ebenfalls angewandte "roller tube method" nach GEY (1933, 1936) ist für die langdauernde Kultur besser geeignet, denn sie beruht auf dem Prinzip, die Kulturen öfters zu waschen, die Stoffwechselprodukte weitgehend herauszulösen, ohne die Röhrchen öffnen zu müssen. Die Explantate werden auf einem dünnen, die Innen- und Außenwände des sterilen Röhrchens bedeckenden Fibrinfilmmembran angesetzt und mit Embryonal-Extrakt überschichtet. So fixiert wird eine Nährlösung nach Wahl hinzugegeben. Die Röhrchen rotieren während der gesamten Kulturzeit in einem im Brutschrank eingestellten Roller, so daß die Gewebefragmente periodisch von der Nährlösung benetzt werden. Im Abstand von 3 - 4 Tagen wird die alte, verbrauchte Nährlösung abgesaugt und durch frische Nährlösung ersetzt.

Das Nährmedium des hängenden Tropfens bestand aus 1 Tropfen Hühnerplasma (HP), 1 Tropfen Chicken Embryo Extrakt (EE) und 1 Mikrotropfen Hühner-Serum (HS). Die Fibrin-Komponente des HP und die Thrombinkomponente des EE führen zu einer Koagulation des hängenden Tropfens. Kurz vor der Koagulation werden die embryonalen Bindegewebs-Explantate in den hängenden Tropfen implantiert, die Epithelien aber auf dem bereits gerinnenden Plasma-Klotz. Die Wasserstoff-Ionen-Konzentration liegt zwischen 7,2 bis höchstens 7,4, Veränderungen dieser Werte führen zu irreversiblen Schäden.

Die Explantate erhielten entweder sofort, bei größtmöglicher Erhaltung der Zytodifferenzierung, oder aber spätestens mit Ansatz der 1. Passage eine bestimmte Testmenge des Antibiotikums dotiert. Im Abstand von 24, 48 und 72 Stunden (Zeitpunkt der besten Reaktion) wurden die Testkulturen nach zytomorphologischen Abweichungen durchgesehen, auffallende Morphen fotografisch dokumentiert. Die Verteilung eines Mikrotropfens von 0,025 ml der 1 mg/1ml-Testlösung eines Antibiotikums mit 0,025 mg Reinsubstanz auf das Gesamtvolumen des Koagulums, 0,4 ml als Fibroblastenmedium und 0,5 ml als Epithelmedium, einer Verteilung auf ein Explantat mit 1,0 - 1,5 mm Kantenlänge bei einer durchschnittlichen Zellzahl von  $10^3 - 10^5$  Zellen ergibt eine Konzentration von 0,04  $\mu\text{g}$  je  $\text{mm}^3$  des Koagulums.

Zur Vervollständigung der Ergebnisse wurden auch 12 Tage alte Hühnerembryonen zu den Untersuchungen verwendet.

Abb. 2 (12 Tage).

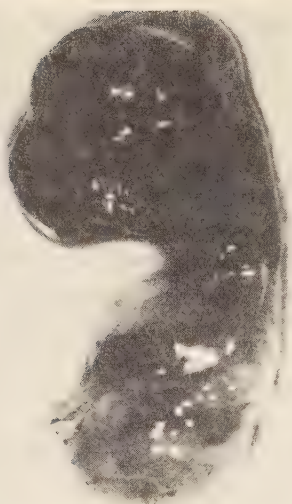


Abb. 1. Hühnerembryo (8-9 Tage alt) kurz nach Extraktion aus dem Ei. - Original, 50 x



Abb. 2. Hühnerembryo (12 Tage alt) sofort nach der Extraktion aus dem Ei fotografiert. Original, 10

Literaturverzeichnis : Material und Methodik

- HARRISON, R.G. : Observations on the living developing nerve fiber. Proc.Soc.exp.Biol.Med.4, 140-143 (1906-1907)
- The cultivation of tissues in extra-neous media as a method of morphogenetic study. Anat.Rec.6, 181-193 (1912)
- CARREL, A. La culture des tissus adultes en dehors  
and BURROWS, M. : de l'organisme.  
C.r.Soc.Biol.Paris 69, 293-294 (1910)
- LEWIS, M.R. The growth of embryonic chick tissues  
and LEWIS, W.H. : in artificial media, agar and bouillon,  
Bull.Johns Hopkins Hosp. 22, 126-127 (1911)
- GEY, G.O. : An improved technique for massive tissue culture. Am.J.Canc.17, 752-756 (1933)
- GEY, G.O. The maintenance of human normal cells  
and GEY, M.K. : and tumor cells in vitro.  
Am.J.Canc.27, 45-76 (1936)
- zu S.159
- KORFSMEIER, K.-H. : Interzelluläre Verbindungen beim Plattenepithelkarzinom der menschlichen Haut in der Gewebekultur.  
Experientia 23, 946 (1967)
- : Epitheliale Hauttumoren und gesundes Hautepithel in der Gewebekultur.  
Arch.klin.exp.Derm.232, 434-444 (1968)

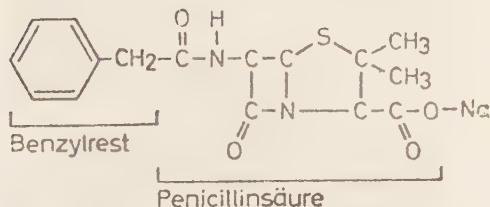




## Experimentelle Untersuchungen:

### Versuchsgruppe I: PENICILLIN

Penicillin G (Na-Salz)



Struktur-Formel des PENICILLINS

PENICILLIN-G-Natrium "Grünenthal"

Charge 70011 und 60023

Explantate vom embryonalen Kardialmuskel und von den Koronargefäßen (Brütungsdauer 9 Tage) wurden in einem Koagulum aus HP + EE + HS angesetzt. In der 1. Passage Zusatz von 1 gtt = 40 i.E. PENICILLIN-G-Natrium. Nach 24 Stunden konnte nur eine zögernd proliferierende Zellmigration der Kardialmuskel-Explantate festgestellt werden, bei den Koronar-Gefäß-Explantaten war eine bedeutend stärkere Proliferation feiner Fibroblasten auffällig. Nach 72 Stunden zeigten beide Gewebe eine starke, stimuliert-wirkende Zellvermehrung. Die starke Proteolyse des Mediums trat hervor. Kontrollkulturen ohne Zusatz zeigten ein starkes, ungehemmtes Wachstum. Koronargefäß- und Darm-Explantate (9 Tg) erhielten in der 1. Passage je Kultur 100 i.E. PENICILLIN-G-Natrium.

Zu Beginn der Testzeit zeigte der größere Teil der Kulturen eine Emigrationshemmung. Dieses Zellbild hatte sich aber nach insgesamt 72 Stunden verschoben: Der größte Teil der Herzkranzgefäß-Fragmente zeigte eine normale Zellproliferation, während ein kleiner Teil noch deutlich inhibiert war.

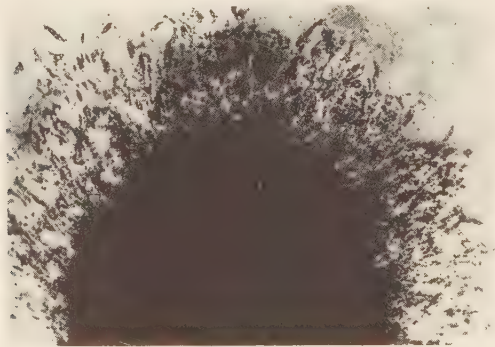


Abb. 3 : Koronargefäß-Explantat vom 9 Tage alten Hühnerembryo. Das dunkelgraue Gewebe entspricht dem Mutterstück, die fingerähnlich auseinanderstrebenden Zellen bilden die Wachstumszone. Zellbild nach Dotation von 100 i.E. PENICILLIN. Gute Zellproliferation mit Speicherung stark lichtbrechender Tröpfchen in den Fibroblasten.  
Original, 200 x



Abb. 3a: Koronargefäß-Explantat gleichen Alters. Kontrollkultur ohne Zusatz einer Testsubstanz. Sehr starke Zellproliferation führt zu einer ausgeprägten Wachstumszone. Original, 200 x



Abb. 4: PENICILLIN-Test. Darm-Explantat (9 Tage) nach Zusatz eines Mikrotropfens mit 66 i.E. PENICILLIN mittelgute Darm-Epithel-Proliferation. Original, 200 x

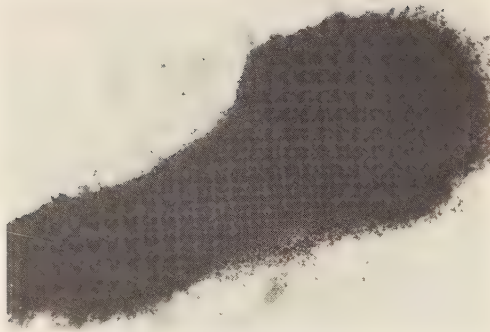


Abb. 4a: Kontrolle ohne Zusatz, zeigt stärkere Zell-Proliferation, Original, 200 x

Epithelkulturen des embryonalen Darmes (9 Tg) zeigten keinen Unterschied in der Migration der Epithelzellen und der Kontrollen, nur auffallend die stärkere Proteolyse bei den Testkulturen.

Kardialmuskel- und Koronargefäß-Kulturen erhielten 40 i.E./1ggt je Kultur. Das Resultat war eine gute, ungehemmte, stimulierte Zellproliferation ohne ein Zeichen einer Hemmung.

Auch mit 80 i.E./1 ggt konnte noch bei Koronargefäß-Kulturen eine stimulierende Wirkung erzielt werden.

|               |     | PENICILLIN-Konzentrationen |     |     |     |     |     |
|---------------|-----|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gewebe        |     | internationalen Einheiten  |     |     |     |     |     |
| Wachstum      | bei | 20                         | 30  | 40  | 50  | 100 | 200 |
| Kardialmuskel |     | +++                        | +++ | +++ | ++  | ++  | +   |
| Koronargefäße |     | +++                        | +++ | +++ | +++ | ++- | +-  |
| Darm          |     |                            |     |     |     | ++- | +-  |

Tabelle 1: Wachstum bei niedrigen PENICILLIN-Gaben

Neben den Ansätzen mit embryonalem Gewebe vom Huhn wurde auch menschliches Foetal-Gewebe explantiert und den Testuntersuchungen unterworfen:

Homo sapiens var. europaeus, Foet mens 3.

Explantiert wurden das Irisepithel, Rippen, Epidermis und Darm. Kultur w.o. Dotation einer Lösung von 50 i.E./1 ml Tyrode. Mäßiges Wachstum, keine PENICILLIN-Inhibition, sondern bedingt durch starke Infektion durch Vaginalflora.

Homo sapiens var. europaeus, Foet, mens 4 - 5 .

Explantiert wurden der Kardialmuskel, das Irisepithel und die Oberschenkel-Muskulatur und mittels der Deckglas-Kultur-Methode, der Roller-Tube-Methode und in Carrelflaschen kultiviert. Nach 48 Stunden Kulturzeit ergab sich bei allen Kulturen eine gute Zell~~pro~~liferation, weil unter der Dotation von 50 i.E. PENICILLIN keine Inhibition sondern eher eine gewisse Stimulation der Zellproleferation eingetreten war.

Zur weiteren Bestätigung dieser bisher aufgezeigten Ergebnisse wurden in einem Versuch 14 Hühnerembryonen (9 Tg) in 5 ml der Nährlösung nach TYRODE mit Zusatz einer Spur PENICILLIN homogenisiert und der Extrakt aus diesem Homogenat zur Kultivierung von Gewebekulturen und zur Wundheilung von Ulcera cruris beim Menschen mit Erfolg verwendet.

Der gleiche Erfolg bestätigte sich bei einem Homogenisat von 15 Hühner-Embryonen (9 Tg) mit einem Zusatz von 100 i.E. PENICILLIN/1 ml Tyrode bei einem Gesamtvolumen von 50 ml TYRODE. Von der Untersuchung weiterer PENICILLINE wurde abgesehen, da sie nur als Einleitung für die interessanteren Gruppen der Aminoglycosid-Antibiotika<sup>u</sup> der TETRACYCLINE gedacht war.

Versuchsgruppe II: STREPTOMYCIN

- 1) Dihydrostreptomycin-Sulfat "Bastian" (DHSTRM)  
"Dihydro Charge

Explantate der für Hemmungstests sehr geeigneten embryonalen Koronargefäße Os frontale und Haut (12 Tg) wurden mit Mikrotröpfchen der im folgenden angezeigten Verdünnungen konfrontiert. Die Empfindlichkeit auf Zugaben zum Nährmedium und dadurch bedingte Milieuverschiebungen ist sehr hoch.

|    | Verdünnung            | Endkonzentration        |
|----|-----------------------|-------------------------|
| a) | 100 mg/1 ml           | 4 $\mu$ g/1 mg Koagulum |
| b) | 10 mg                 | 0,4 $\mu$ g             |
| c) | 1 mg                  | 0,04 $\mu$ g            |
| d) | 0,1 mg                | 0,004 $\mu$ g           |
| e) | 0,01 mg               | 0,0004 $\mu$ g          |
| f) | Kontrolle ohne Zusatz | -----                   |

Dieser Ansatz in einem Medium aus HP (Difco) + EE (Ultrafiltrate Difco) + HS (Hühnerserum Difco) ergab nach einer Gesamtkulturzeit von 72 Stunden folgende Resultate:

Bei Konzentration a) stark gehemmte Zellproliferation mit epithelzellähnlicher Verbildung der Fibroblasten ist als kennzeichnend eruiert worden für die Zytotoxizität dieser Konzentrationsstufe. (Abb. 5 und 6)

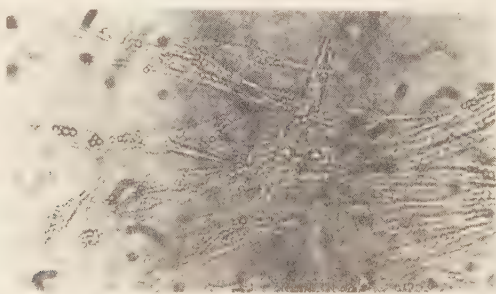


Abb. 5:Koronargefäß-Expl.(12 Tg) nach STRM-Gabe. Zellen der Wachstumsrand-Zone sind aufgequollen und enthalten kleine stark lichtbrechende Tröpfchen. Original, 1200 x



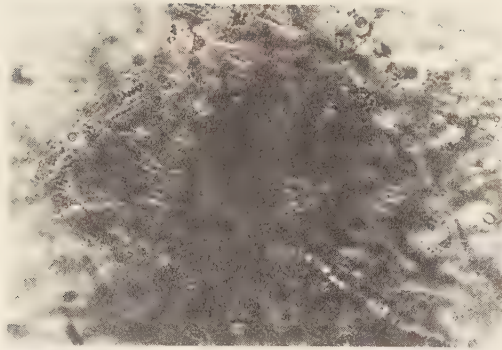


Abb. 6: Os frontale (12 Tg) nach Applikation der gleichen Dosis, 1 g STRM : 100 ml Lösungsmittel, Stadium nach 3 Tagen ; Kulturzeit: Phagozytiertes Testmittel verkürzt die Zellen in ihrer Längsachse. Original, 1200 x

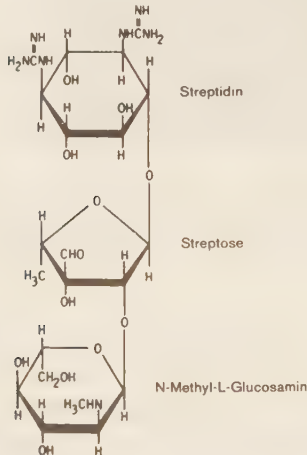
- b) Geringe Proliferation und epithelzellähnliche Morphe der Fibroblasten als Zeichen einer Inhibition.
- c) Bei dieser Konzentration, der Grenzkonzentration, stehen 50 % gute, aber retardierte Zellproliferation, 50 % mit einem guten, feinfaserigen Zellwachstum gegenüber.
- d) Gute bis sehr starke, stimulierte Proliferation feiner Fibroblasten, schmaler Osteoblasten und von Hautbrugeewebe und -Epithelien.
- e) Je kleiner die Testgabe ausfällt, desto stärker die Stimulierung des Zellwachstums.
- f) Kontrollkulturen ohne Zusatz zeigen ein gutes, aber nicht so auffallend und augenscheinlich stimuliertes Wachstum wie unter e) .

| Gewebe        | /ug - | Wachstumsreaktion auf DIHYDROSTREPTOMYCIN |     |      |       |        | Kontrolle |
|---------------|-------|-------------------------------------------|-----|------|-------|--------|-----------|
|               |       | 4                                         | 0,4 | 0,04 | 0,004 | 0,0004 |           |
| Koronargefäße |       | ---                                       | +++ | +-   | +++   | ++++   | +++       |
| Os frontale   |       | ---                                       | +++ | +-   | ++-   | +++    | +++       |
| Haut          |       | ---                                       | +++ | +-   | ++-   | ++     | ++        |

Tabelle 2: Wachstumsreaktion auf DIHYDROSTREPTOMYCIN-Sulfat

Diese zellulären Erscheinungsbilder blieben auch nach einer Kulturzeit von insgesamt 5 Tagen erhalten.

2) Streptomycinsulfat "Hoechst" (STRM)  
Charge Op Nr. 916



Strukturformel des STREPTOMYCINS

In einem Ansatz von Koronargefäßen, Os frontale und Haut (12 Tg) wurden ähnlich wie bei dem vorangegangenen Ansatz je 6 Konzentrationsstufen zur Anwendung gebracht.

| Verdünnung |                       | Endkonzentration 1 gtt = $\frac{1}{50}$ ml |      |         |             |
|------------|-----------------------|--------------------------------------------|------|---------|-------------|
| a)         | 1 g STRM : 5 ml       | 0,2                                        | g/ml | 0,004   | g 4 /ug     |
| b)         | : 10 ml               | 0,1                                        | g/ml | 0,002   | g 2 /ug     |
| c)         | : 100 ml              | 0,01                                       | g/ml | 0,0002  | g 0,2 /ug   |
| d)         | : 500 ml              | 0,002                                      | g/ml | 0,00004 | g 0,004 /ug |
| e)         | : 1000 ml             | 0,001                                      | g/ml | 0,00002 | g 0,002 /ug |
| f)         | Kontrolle, R-L-Lösung |                                            |      |         |             |

Nach 3 Tagen Kulturzeit konnte folgendes zytologisches  
Endresultat eruiert werden:

Koronargefäße:

- a) Totale Inhibition
- b) Ebenfalls vollständige Inhibition
- c) Noch gehemmte bis retardierte Zellproliferation  
(Abb. 7 und 7a)

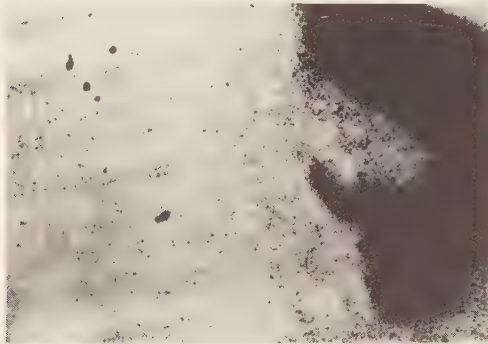


Abb. 7. Koronargefäß-Explantat mit noch gehemmter Zell-  
proliferation. Original, 200 x



Abb.7a. Kontrolle ohne Zusatz. Starke ungehemmte Zell-  
proliferation. Original, 200 x

- d) Mäßig-gute, retardierte Zellvermehrung
  - e) Gute, ungehemmte Zellmigration
  - f) Kontrollen, ohne Zusatz: Gute Zellproliferation
- Die Zellbilder folgen im Mikrofotogramm.

| Gewebe        | Wachstumsreaktion auf STREPTOMYCIN-Sulfat |            |              |                |                |           |
|---------------|-------------------------------------------|------------|--------------|----------------|----------------|-----------|
|               | 4, $\mu$ g                                | 2, $\mu$ g | 0,2, $\mu$ g | 0,004, $\mu$ g | 0,002, $\mu$ g | Kontrolle |
| Koronargefäße | ---                                       | ---        | --+          | -+             | +++            | ++        |
| Os frontale   | ---                                       | ---        | ---          | -+             | +++            | +++       |
| Haut          | ---                                       | ---        | --+          | --+            | -++            | ++        |

Tabelle 3: Wachstum nach STREPTOMYCIN-Konfrontation

Bei beiden STREPTOMYCIN-Verbindungen muß auf den geringen Unterschied der Reaktionen zwischen beiden Komponenten besonders hingewiesen werden. Die Reaktionen der Gewebefragmente sind bei sehr hohen Verbindungen sehr ähnlich, aber nicht gleich.

Os frontale:

- a) Totale Inhibition
- b) Inhibition
- c) Gute Proliferation
- d) Sehr gute, stimulierte, Proliferation
- e) Sehr gute, stimulierte, Zellvermehrung
- f) Kontrolle: Ungehemmte Zellproliferation

(siehe Abb. 8 und 8a)



Abb. 8. Os frontale-Kultur nach Gabe von  $0,2 \mu\text{g}$  STREPTOMYCIN zeigt eine gute Zellproliferation  
Original, 200 x



Abb. 8a. Kontrollkultur weist eine feinfädige Osteoblastenproliferation weit in das Medium auf.  
Original, 200 x

Haut:

- a) Totale Inhibition
- b) Ebenfalls vollständige Inhibition
- c) Ganz geringe, stark gehemmte Proliferation
- d) Mäßige Epithelproliferation, starke Tröpfenspeicherung
- e) Mäßig-geringe Proliferation (Abb. 9 und 9a)

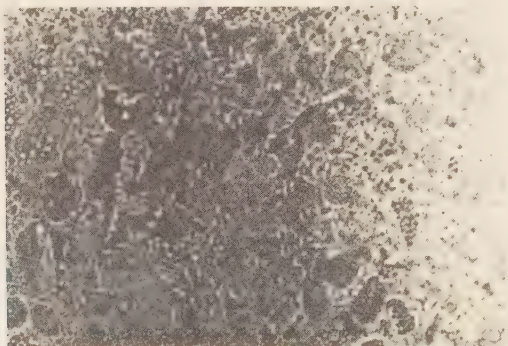


Abb. 9. Haut (12 Tg) unter der Einwirkung von 1 Mikrotröpfchen einer Testlösung von 1 g STRM : 500 ml Lösungsmittel. Mäßig-gute, retardierte Zellvermehrung mit Speicherung der Testlösung. Original, 400 x

(Abb. 9a s.S. )



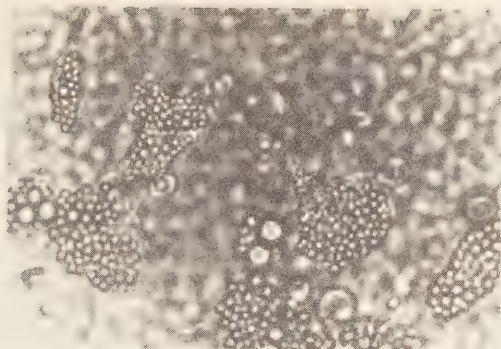


Abb. 9a. Zellen der Haut mit phagozytierten, stark lichtbrechenden Tröpfchen unterschiedlicher Größe. Original, 2000 x

f) Kontrolle: Gute Zellvermehrung, ohne Tröpfchenspeicherung

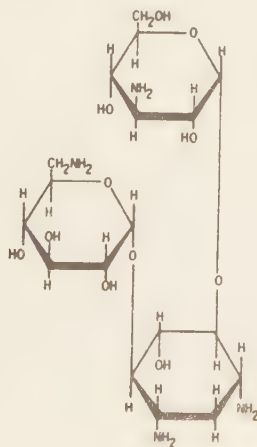
Die Reaktionen beider Verbindungen waren sehr ähnlich.  
(s.Tab. 3, S. )

Versuchsgruppe III: KANAMYCIN

Formel von KANAMYCIN:

Kanamytrex - Boehringer  
"Ingelheim"

Charge-Nr. 49033 u. 23510



Kanamycin

Explantate des embryonalen Kardialmuskels (16 Tg) und der Koronargefäße (16 Tg) wurden mit unterschiedlichen Testkonzentrationen des Kanamycin-Sulfats in vitro konfrontiert. Zur Anwendung kamen folgende Endkonzentrationen 4  $\mu$ g, 0,4  $\mu$ g und 0,04  $\mu$ g. Nach 48 Stunden Kulturzeit zeigten Kardialmuskel-Explantate bei der Testlösung a) = 4  $\mu$ g eine starke Proteolyse, aber keine Zellproliferation. Bei b) = 0,4  $\mu$ g ebenfalls keine Zellmigration und erst bei der Lösung c) = 0,04  $\mu$ g war an den Schnittkanten eine stark gehemmte Zellproliferation zu bemerken.

Die Kontrollen (ohne Zusatz) ergaben ein starkes, ungehemmtes Zellwachstum.

Die Koronargefäß-Explantate reagierten auf 4  $\mu$ g mit einer totalen Inhibition der Zellvermehrung. Bei 0,4  $\mu$ g reagierten die Gewebsfragmente zu 50 % mit einer Proliferation verbildeter Fibroblasten und zu 50 % mit einer partiellen Inhibition der Zellvermehrung. Auch Lösung c) = 0,04  $\mu$ g bewirkte eine Hemmung, die sich in "monolayer"-ähnlichen Wachstumszonen epithelzell-ähnlich verbildeter Fibroblasten äußerte.

Die Kontrollen wiesen eine starke, ungehemmte Proliferation feiner Fibroblasten auf.

Um diese Befunde zu stützen, wurden Koronargefäß-Explantate (12 Tg) mit folgenden Konzentrationen konfrontiert

|           | Verdünnung | g pro ml | Endkonzentrat/gtt |
|-----------|------------|----------|-------------------|
| a) 1      | g : 10 ml  | 0,1      | (2 mg)            |
| b) 0,1    |            | 0,01     | (0,2 mg)          |
| c) 0,01   |            | 0,001    | (0,02 mg)         |
| d) 0,001  |            | 0,0001   | (0,002 mg)        |
| e) 0,0001 |            | 0,00001  | (0,0002 mg)       |

Nach 72 Stunden Kulturzeit ergaben sich folgende zytomorphologische Veränderungen an den Wachstumszonen der Kulturen:

- a) Keine Zellproliferation
- b) 75 % Inhibition, 25 % gute Proliferation
- c) 75 % gehemmte, mäßige Proliferation, 25 % starke Proliferation.  
Hier scheint der Umschlagspunkt von der Inhibition zur Proliferation zu liegen.
- d) Starke Proliferation von feinen Fibroblasten
- e) Starke, stimulierte Zellproliferation
- f) Kontrollen (ohne Zusatz) zeigen eine sehr starke, ungehemmte Zellvermehrung.

Sämtliche Befunde blieben auch über eine verlängerte Kulturzeit erhalten.

Wurden Koronargefäß-Explantate, Os frontale-Explantate und Hautfragmente vom 12 Tage bebrüteten Huhn mit einem Mikrotröpfchen der Originallösung von KANAMYTREX und mit einer Verdünnung von 1 g KANAMYTREX : 100 ml Lösungsmittel diesen Kulturen zugesetzt, so ergab sich folgendes Bild:

- 1) Koronargefäße
  - a) Originallösung. Auffallende Antikoagulations-Wirkung verhindert Gelbbildung des Mediums. Totale Inhibition.
  - b) 1 g : 100 ml : Vollständige Inhibition
- 2) Os frontale
  - a) Totale Inhibition
  - b) Vollständige Inhibition
- 3) Haut
  - a) Totale Inhibition
  - b) Abtropfen von Zellen aus den Federanlagen, Zerstörung der Federpapillen, ganz geringe Zellproliferation
  - c) Membranbildung weitgehend zerstört



Abb. 10. Haut (12 Tg) Zerstörung der Federanlage durch KANAMYCIN-Konzentration 1 g : 100 ml. Orig. 200 x

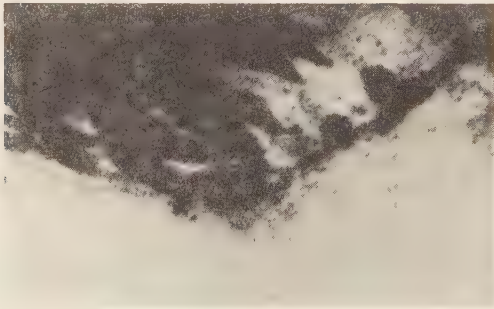


Abb. 10a. Hautkultur nach Zusatz eines Mikrotropfens einer Lösung von 1 mg KANAMYCIN : 100 ml Lösungsmittel. Zerstörung der Wachstumszone Original, 200 x



Abb. 10b. Haut eines 12 Tage alten Hühnerembryos, ohne Zusatz als Kontrolle . Original, 200 x

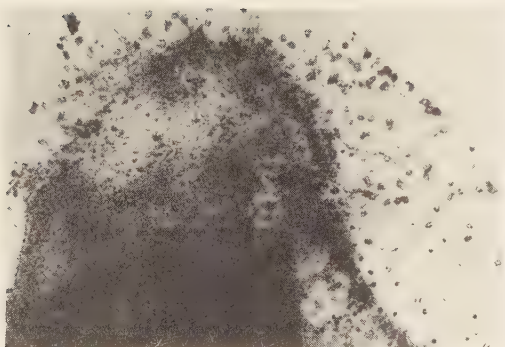


Abb. 11. Hautkultur nach Zusatz von 0,02 mg KM. Das Antibiotikum bezweckt eine Auflösung der ursprünglich vorhandenen Epithelmembran. Original, 200 x

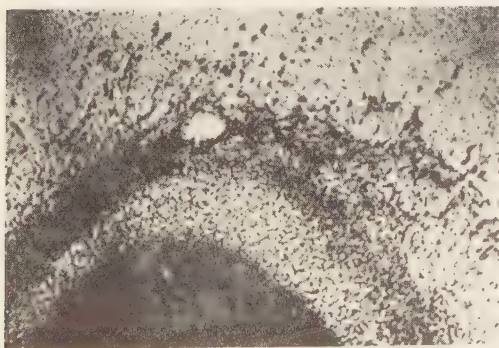


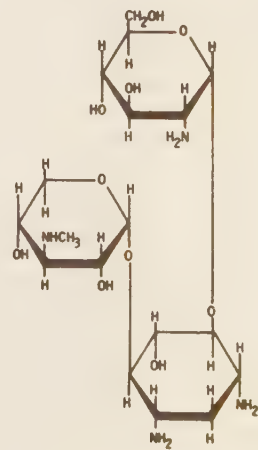
Abb. 11a. Kontrolle ohne Zusatz weist eine noch vollständige Epithelmembran auf.  
Original, 200 x

| Gewebe             | Endkonzentrationen der KANAMYCIN-Gaben/pro Kult. |          |         |           |            |         |         |           |           |
|--------------------|--------------------------------------------------|----------|---------|-----------|------------|---------|---------|-----------|-----------|
|                    | Orig.<br>Lösgr                                   | 10<br>mg | 2<br>mg | 0,2<br>mg | 0,02<br>mg | 4<br>µg | 2<br>µg | 0,4<br>µg | 0,2<br>µg |
| Kardial-<br>muskel | ---                                              | ---      | ---     | ++        | ++         | ---     | ---     | ---       | ---       |
| Koronar-<br>Gefäße | ---                                              | ---      | ---     | ++        | +          | ---     | ---     | ---       | ---       |
| Os fron-<br>tale   | ---                                              | ---      | ---     | ++        | +          | ---     | ---     | ---       | ---       |
| Haut               | ---                                              | ---      | ++      | ++        | +          | +       | +       | +         | ++        |

Tabelle 4: Proliferation der Gewebefragmente nach  
KANAMYCIN-Dotation

Versuchsgruppe IV: GENTAMYCIN

Formel von GENTAMYCIN



Gentamycin

A. Wirkung des GENTAMYCIN (Refobacin<sup>(r)</sup>) auf embryonale  
Gewebe in vitro. Charge W 325 und 1402

Versuchsserie 1: Testlösung 1 mg GENTAMYCIN (GM) : 1 ml  
phys. NaCl-Lösung

Bindegewebs-Explantate: Kardialmuskel (9 Tg), Koronar-  
gefäße (9 und 12 Tg), Os frontale (12 Tg) und Epithel-  
gewebe: Iris (12 Tg), Leber (12 Tg), Epidermis (9 Tg),  
Darm (9 Tg), Rückenmark und Lunge (12 Tg) erhielten nach  
dem Durchlaufen einer Kulturzeit von 3 Tagen in der  
1. Passage 1 gtt = 0,014 - 0,016 mg einer Konzentration  
von 1 mg GM : 1 ml Lösungsmittel. Die Bindegewebs-Ex-  
plantate zeigten sämtlich nach 24 Std. Konfrontation eine  
starke Fibroblastenproliferation mit einzelnen aus der  
Wachstumszone herausgelösten Zellhäufchen. Die Einzel-  
zellen waren durch die phagozytierte Testlösung aufge-  
bläht.



Abb. 12. Kultur vom Kardialmuskel (12 Tg) nach GENTAMYCIN-  
Applikation in der 1. Passage, Konzentration  
1 mg/1 ml. Starke Verkürzung und Speicherung  
der Testlösung. Original, 500 x



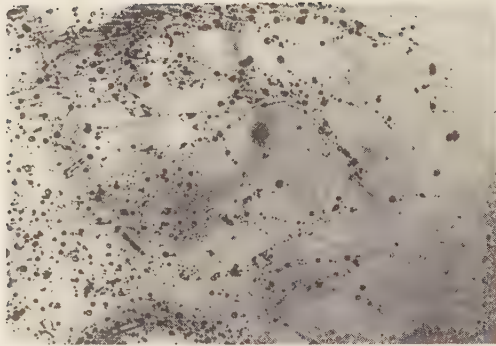


Abb. 12a. Kontrolle, ohne Zusatz, zeigt die typischen langen und schmal konfigurierten Herzfibroblasten. Original, 500 x

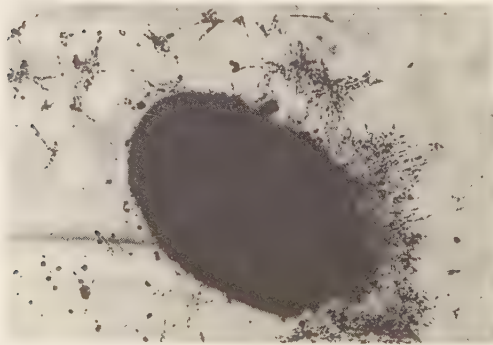


Abb. 13. Haut-Explantat nach Dotation von 1 Mikrotropfen einer Konzentration von 1 mg GM : 1 ml Lösungsmittel : Starke Inhibition mit Lyse der Wachstumszone. Original, 200 x

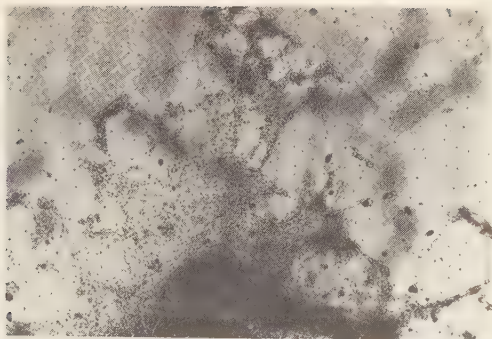


Abb. 13a. Kontrolle der Haut vom 9 Tg-Huhn mit Proliferation des Hautepithels. Original, 200 x



Abb. 14. Koronargefäß-Explantat (12 Tg) wurde mit einer Testlösung von 1 mg GM : 1 ml Lösungsmittel konfrontiert. Hemmung der Fibroblastenproliferation. Original, 120 x

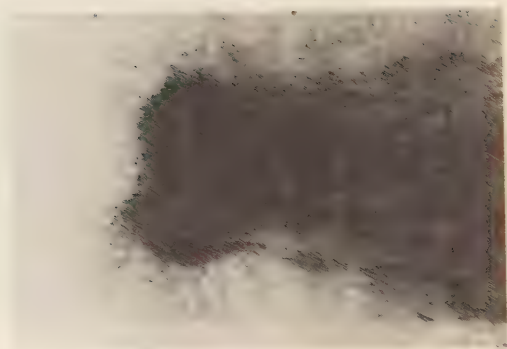


Abb. 14a. Koronargefäß-Explantat (12 Tg) in der Konfrontation mit 1 Mikrotropfen von 2 mg 3M, 1 ml Lösungsm.; Stärkere Inhibition der Fibroblastenproliferation. Original, 110 x

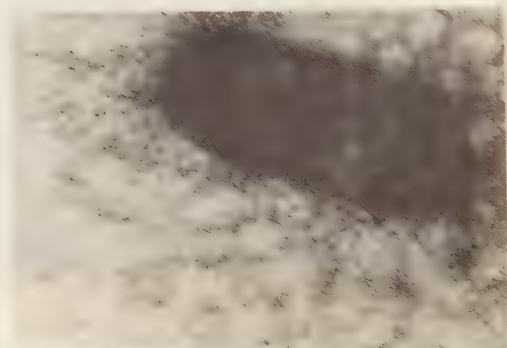


Abb. 14b. Kontrollkultur ohne Zusatz zeigt das typische Bild der ungehemmten, starken Fibroblastenproliferation. Original, 110 x

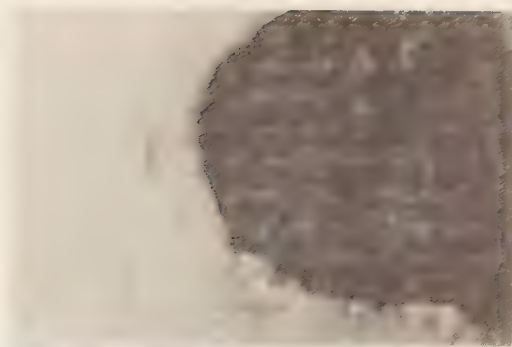


Abb. 15. Zellkultur von embryonaler Kardiomyozyten, nach Zugabe von 2 Mikrolitern einer Lösung von  $1 \text{ mg GW} \times 1 \text{ ml}$  Lösung. Fast vollständige Inhibition der Zellviabilität. Original,  $200 \times$ .



Abb. 16. Zellkultur von embryonaler Kardiomyozyten, Zugabe von Lösung  $1 \text{ mg GW} \times 10 \text{ ml}$  Lösung. Keine noch erkennbare oder nur reduzierte Fibroblastenproliferation. Original,  $200 \times$ .



Abb. 17. Kardialmuskel-Kultur (Bebrütungszeit 9 Tage) nach Zugabe von 0,016 mg einer Lösung von 1 mg GENTAMYCIN in 1 ml physiolog. NaCl-Lösg. Mäßig gehemmte Proliferation. Original, 200 x



Abb. 17a. Kontrollkultur vom Kardialmuskel ohne Zusatz der Testsubstanz. Die Breite der Wachstumszone entspricht dem mittleren Wachstumspotential. Original, 200 x

48 Stunden nach Dotation trat eine starke Lyse sowohl des Mediums als auch der Wachstumszone auf. Nach 72 Stunden Kulturzeit scheint die Inhibition auf Grund des Konzentrationsgefälles innerhalb des Explantats überwunden. Es beginnt eine vollkommen neue Zellproliferation vom Explantat aus. Die Kontrollen dagegen zeigen ein ungehemmtes Wachstum feiner und feinsten Fibroblasten.

Das gleiche Zellbild zeigten die Osteoblasten des embryonalen Os frontale.



Abb. 18. Os-frontale-Kultur (9 Tage) mit Hemmung der Osteoblastenproliferation nach Zusatz eines Mikrotröpfchens der Testlösung 1 mg/1 ml. Original , 200 x



Abb. 18a. Spitze des Os frontale vom embryonalen Huhn.  
Kontrollkultur zeigt eine ungehemmte Proliferation feiner Osteoblasten.  
Original, 200 x

Epithel-Fragmente der Epidermis, der Leber, des Darmes und das Pigmentepithel der Iris unterschieden sich in ihren Reaktionen auf die Testsubstanz nicht wesentlich. Der eine Teil der Kulturen ist vollständig gehemmt, während der andere noch eine geringe Zellmigration aufweist. Die Explantate zerstören durch ihre Fermentaktivität die Wachstumszone und führen zur Ansiedlung von kleinen Zellkolonien auf dem Gebiet der ursprünglichen Proliferationszone.

( Abb. 19, 20, 21 )



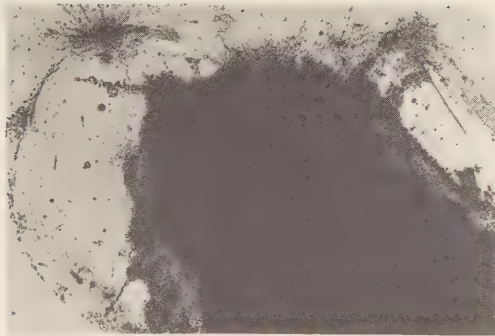


Abb. 19. Bild einer Proliferationszone einer Hautkultur nach Umsetzen in der 1. Passage. Teilweise Lyse der Wachstumszone nach GM-Gabe von 1 mg/1ml. Original, 200 x

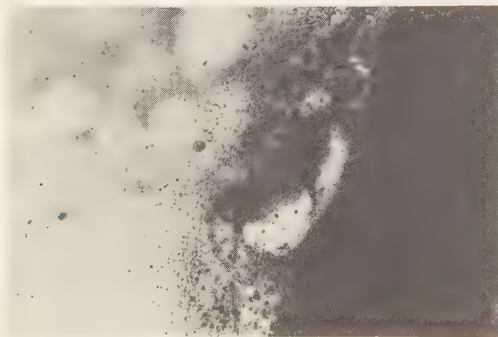


Abb. 20. Testkultur von embryonaler Haut (9 Tg) nach Anwendung der Lösung 1 mg/5 ml, noch gehemmte Epithelproliferation mit Lyseherd. Original, 200 x

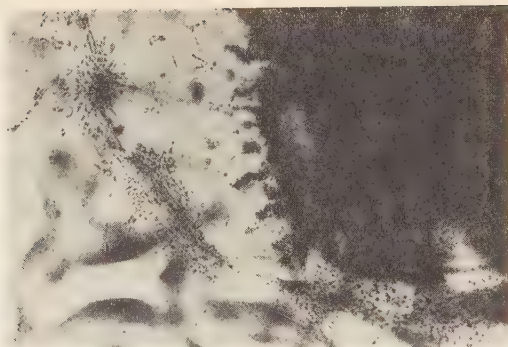


Abb. 21. Haut (9 Tg) zeigt die Follikel-Auflösung nach  
GM-Gabe 1 mg/20 ml.  
Original, 200 x

Der auffällige Mitosestop bei den Epithelkulturen ist auf eine größere Sensibilität gegenüber der Testsubstanz zurückzuführen.

Testkulturen von Rückenmark und Lunge (12 Tg) zeigten auch das Bild einer starken Inhibition.

Die Flüssigkeits-Kultur auf Perlonnetz und einem flüssigen Nähemedium, die Empfindlichkeit der Reaktion ist wesentlich erhöht, zeigte das signifikante Bild einer vollständigen Inhibition der Zellproliferation, während die Kontrollen eine starke thigmotaktische Migration der Fibroblasten entlang der Faser aufwiesen.

#### Versuchsserie 2 Testlösg. 1 mg GM : 2 ml

In diesen Untersuchungen wurden Epithel- und Bindegewebs-Explantate (9-12 Tg) mit der obigen Verdünnung ausgetestet. Kardialmuskel-Fragmente, Koronargefäß-Explantate und embryonales Os frontale (9 u. 12 Tg) wiesen nach 24 Stunden zum kleineren Teil einen Mitosestop auf, während

der größere Teil eine mäßige stark epithelähnlich, verformte Proliferation zeigte. Nach 72 Stunden hatte sich das Zellbild zu einer uneinheitlichen Form verbildet. Starke Fermenttätigkeit hatte die ursprüngliche Wachstumszone zerstört. Einzellzellen wuchsen "monolayer"-artig an dem Deckglas. Einzelne solitäre Fibroblasten ragen aus der Wachstumszone.

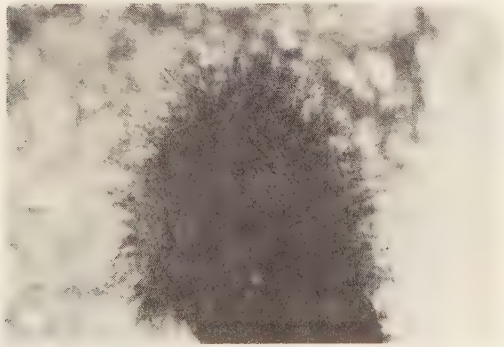


Abb. 22. Auswirkungen eines Zusatzes von 5 mg GM : 1 ml Lösgm. Je Kultur nur 1 Mikrotröpfchen. Kardialmuskel (12 Tg) weist eine starke Inhibition auf.  
Original, 120 x

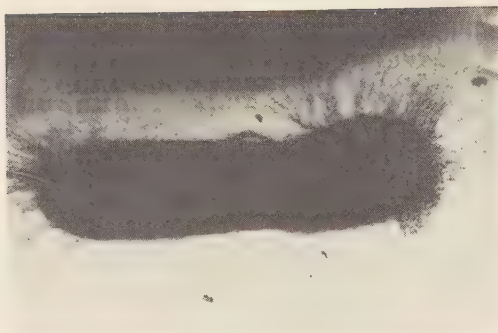


Abb. 22a. Die gleiche Konzentration wirkt sich bei einem Koronargefäß-Explantat ähnlich aus, starke Inhibition der Zellemigration. Original, 120 x

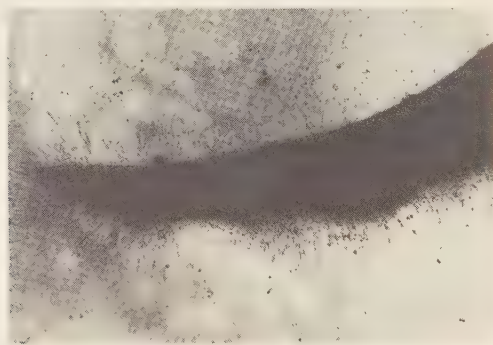


Abb. 22b. Die gleiche Konzentration auf die Osteoblastenproliferation einwirkend. Eine starke Hemmung der Zellproliferation ist feststellbar. Original, 120 x

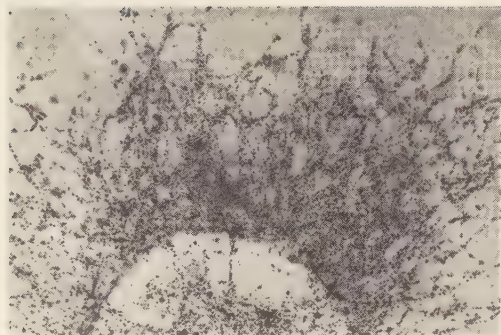


Abb. 23. Koronargefäß-Fibroblasten-Wachstum nach Zusatz einer Testlösung von 1 mg GENTAMYCIN : 2 ml physiologischer NaCl-Lösg. Gute Zellproliferation mit geringgradiger Speicherung der Testlösung. Partielle Lyse der Wachstumszone. Original, 120 x

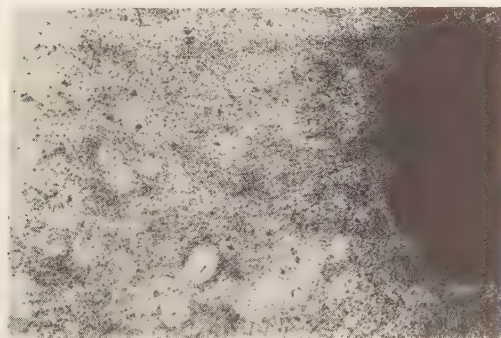


Abb. 23a. Kontrollkultur eines Koronargefäß-Explantats (9 Tage) mit ungehemmter Fibroblasten-Proliferation. Original, 120 x

Die Milz-Explantate (12 Tg) zeigten dagegen keine Mitosestörungen. Sie proliferierten ohne feststellbare Inhibition.

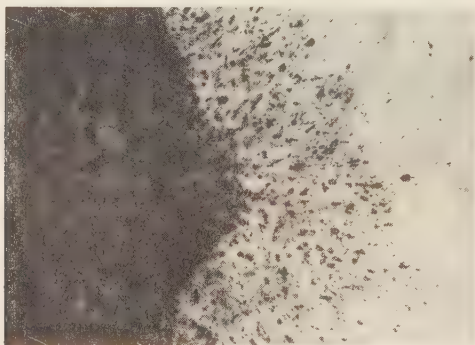


Abb. 24. Milz-Explantat (12 Tg) nach GM-Anwendung  
1 mg/2 ml gehemmte Milz-Zellproliferation  
Original, 200 x



Abb. 24a. Milz-Explantat. Zellvergrößerung an der Wachstums-  
rand-Zone. Phagozytose von Testlösung für zur Auf-  
treibung der Zellen. Original, 500 x





Abb. 24b. Kontrolle ohne Zusatz zeigt starke Zell-  
emigration. Original, 500 x



Abb. 25. Milz (12 Tg) zeigt trotz GM-Gabe von 1 mg GM :  
2 ml fast keine Hemmung, sondern eine gute  
Milzzell-Emigration. Original, 120 x





Abb. 25a. Kontrollkultur der embryonalen Milz  
zeigt ein typisches Epithelwachstum,  
Original, 120 x

Die Os-frontale-Explantate (12 Tg) wurden durch den Anfangsschock nicht in ihrer Zellproliferation und Emigration behindert. Durch die hohe Proliferationspotenz wurde ein geringer Rückstand aufgeholt und nach 72 Stunden Kulturzeit konnte kein Unterschied zwischen Test- und Kontroll-Kulturen festgestellt werden

(s. Abb. 26, 26a, 26b)

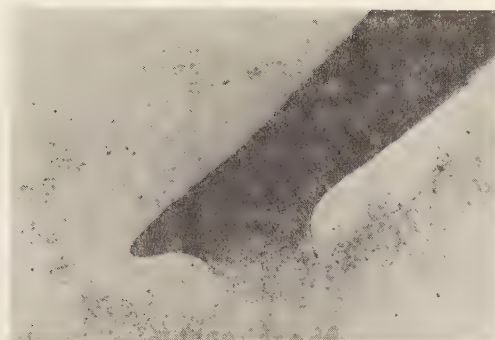


Abb. 26. Os frontale (12 Tg) + 1 mg GM : 5 ml (1 gtt)  
weist eine starke Inhibition auf. Original, 120 x



Abb. 26a. Os-frontale-Kultur nach Dotation von 1 gtt  
einer Lösung von 1 mg GM : 10 ml Lösungsmittel.  
Mäßige Zellproliferation. Inhibition noch merk-  
bar. Original, 120 x

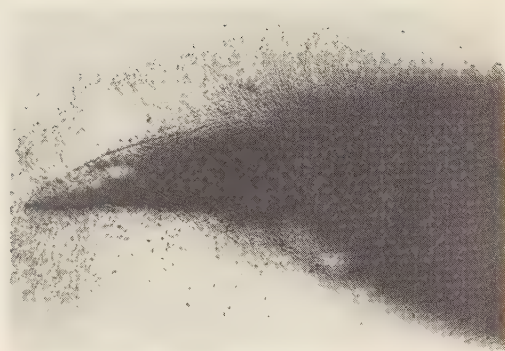


Abb. 26 b. Os-frontale-Kultur, ohne Zusatz, zur Kontrolle.  
Original, 120 x

Epithel-Explantate des Darmes und der Leber zeigten nach der Dotation nur geringe Unterschiede. Ovalzellige Elemente emigrierten in die Wachstumszone. Aber dieses Bild zeigte in der gesamten Kulturzeit keine Progression. So blieb auch bei diesen Kulturen das Bild eines profunden Mitosestops.

(s. Abb. 27 bis 29a)

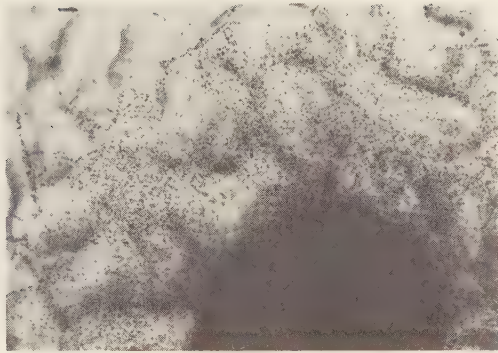


Abb. 27. Kardialmuskel-Explantat konfrontiert mit der Testlösung 1mg/2 ml in der 1.Passage, keine Inhibition. Original, 200 x



Abb. 27a. Kontrolle zur Testkultur zeigt ungehemmtes Wachstum. Original, 200 x



Abb. 28. Leber-Explantat (12 Tg) nach Konfrontation mit Lösung 1 mg GM : 2 ml Lösungsmittel, Inhibierte Proliferation. Original, 120 x



Abb. 28a. Leber-Explantat, ohne Zusatz, zur Kontrolle. Leber-Epithel-Proliferation. Original, 120 x

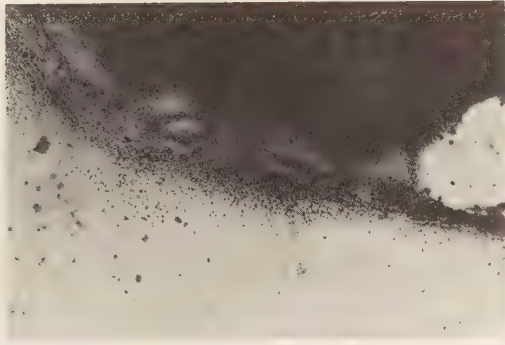


Abb. 29. Haut (9 Tg) nach Dotierung 1 gtt einer Lösung von 1 mg GM : 5 ml weist auf eine starke Inhibition der Zellvitalität hin. Original, 200 x

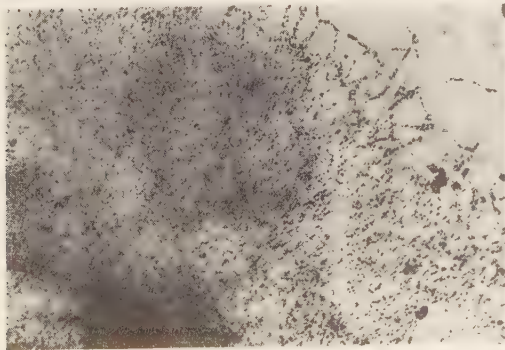


Abb. 29a. Kontrollkultur, ohne Zusatz, ungehemmte starke Proliferation. Original, 200 x

Versuchsserie 3: Testlösungen 1 mg GM : 5, 10, 20 ml

Bindegewebs-Fragmente vom embryonalen Kardialmuskel, den Koronargefäßen und vom Os frontale wurden mit den obigen Testlösungen angesetzt.

Kardialmuskel-Explantate (9 Tg) zeigten nach 24 Stunden mit der Testlösung vom 1 mg GM : 5 ml Lösungsmittel keine Inhibition. Bei den beiden anderen Verdünnungen trat eine auffallende Stimulation der Zellvermehrung auf. Dieser Zustand blieb auch über eine längere Kulturzeit erhalten.

Die Zellelemente der äußeren Wachstumsrandzone wiesen eine etwas gestauchte Morphe auf, mit starker Speicherung der Testsubstanz-Lösung.



Abb. 30. Zellen aus der Randzone eines Kardialmuskel-Explantats gleichen Alters nach Zusatz eines Tröpfchens der Testlösung von 1 mg GENTAMYCIN : 10 ml physiolog. NaCl-Lösung. Starke Speicherung der Testsubstanz. Original, 450 x



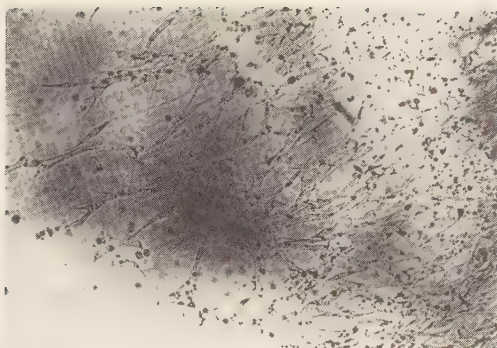


Abb. 30 a. Zellbild einer Wachstumszone einer Kardial-  
muskel-Kultur ohne Testzusatz als Kontrolle.  
Original, 450 x

Bei Konfrontation dieser drei Verdünnungen traten bei Os-frontale- und Koronargefäß-Kulturen keine Hemmeffekte auf, nur die starke Lyse des Mediums durch aktive proteolytische Fermente gab einen Hinweis auf die biologische Abwehr des zugesetzten Teststoffes.

Eine wesentlich empfindlichere Reaktion löste der Zusatz der drei Verdünnungen bei Explantaten der Leber und der Epidermis (9 Tg) aus. Die Leberkulturen ließen eine ausgeprägte Histio- und Cytolyse erkennen, bei den Epidermiskulturen proliferiert eine durch zahlreiche Lysefoci unterbrochene Epithelmembran.

Versuchsserie 4: Testlösungen 2 mg, 3 mg u. 4 mg GM : 1 ml

Der große Unterschied der Dosis-Toleranz zwischen dem Bindegewebe und dem Epithel wurde in den vorherigen Ansetzen deutlich. Daher sollte der Effekt der Testdosis-Erhöhung ermittelt werden.

Kardialmuskel-, Koronargefäß- und Os-frontale-Kulturen erhielten in der 1. Passage 1 gtt der Testlösungen. Bei der Lösung von 2 mg : 1 ml Lösungsmittel trat ein cytotoxischer Effekt auf, der sich in einer Verzögerung der Mitose (Mitosis retardata) äußerte. Die Fibroblasten erscheinen verkürzt und aufgebläht. Bei den beiden anderen Konzentrationsstufen besteht eine profunde Inhibition, gefolgt von einer durchgreifenden Lyse der Proliferationszone. Die aus dem Gewebeverband herausgelösten Fibroblasten konglomerieren sich zu Zellhäufchen, ohne sichtbare Vermehrung und phagozytieren das durch den proteolytischen Prozeß verflüssigte Medium. Die Kontrollen dagegen zeigen keine Lyse des Mediums und der Wachstumszone und eine ungehemmte Zellmigration.

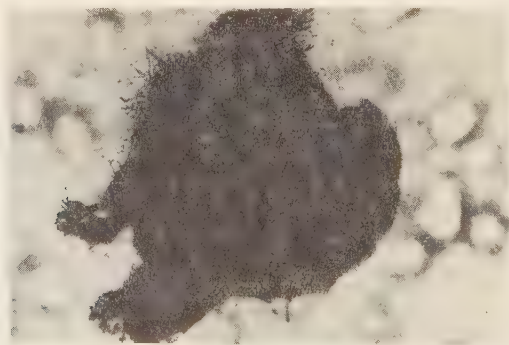


Abb. 31. Drei Tage Kultur nach der Applikation einer Testlösung (20 mg : 1 ml) auf den 9 Tage alten Kardialmuskel weist diese Kultur eine sehr starke Hemmung der mitotischen Vermehrung der Fibroblasten auf. Original, 120 x

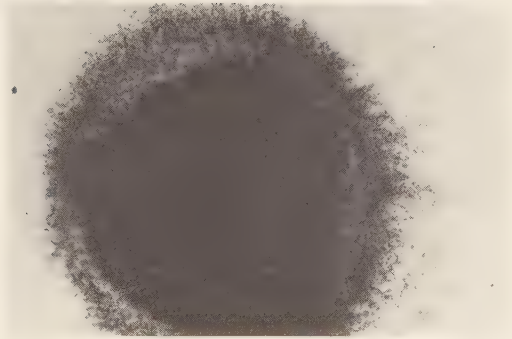


Abb. 31a. Kontrollkultur vom embryonalen Kardialmuskel ohne Hemmstoffzusatz. Sie zeigt eine Zone ungehemmter Zellproliferation feinsten Herzmuskelfibroblasten. Original, 120 x

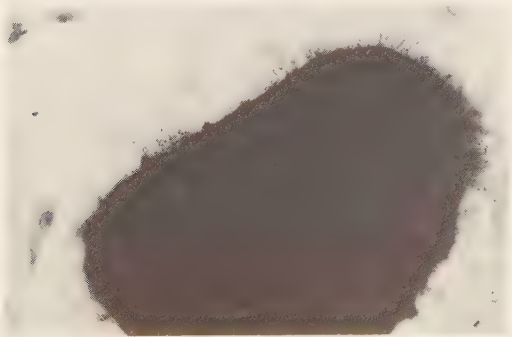


Abb. 32. Kardialmuskel-Explantat (12 Tage) mit minimaler, sehr stark inhibierter Fibroblasten-Proliferation nach Zusatz eines Mikrotröpfchens einer Testlösung von 4 mg GENTAMYCIN : 1 ml physiolog. NaCl-Lösung. Original, 120 x

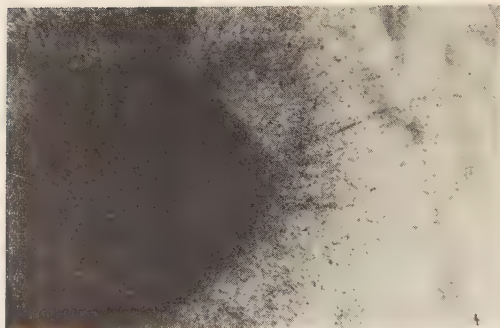


Abb. 32a. Kontrollkultur vom Kardialmuskel, ohne Zusatz, ungehemmtes Fibroblastenwachstum.  
Original, 120 x

Epithelgewebe von Lunge, Leber, Epidermis und Niere (12 Tg) wurden mit der Testkonzentration von 5 mg GM : 1 ml Lösungsmittel angesetzt. Infolge der toxischen Einwirkungen dieser Konzentration wiesen fast alle Epithelkulturen auch nach 96 Stunden das Bild einer starken Proliferationshemmung mit Proteolyse von Medium und Explantat-Schnittkanten auf.

Nur die Epidermis-Explantate zeigten nach 96 Stunden eine beginnende Zellproliferation.

(s. Abb. 33, 33a und 34, 34a)



Abb. 33. Auswachsendes Lungenepithel (12 Tg) nach einem Zusatz 1 gtt einer Lösung von 5 mg GM : 1 ml. Starke Inhibition der Epithelproliferation. Original, 200 x

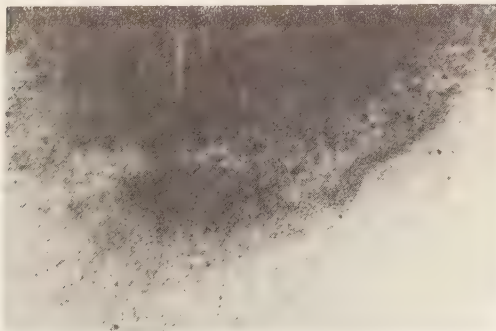


Abb. 33a. Kontrolle zeigt starke Lungenepithel-Proliferation. Original, 200 x

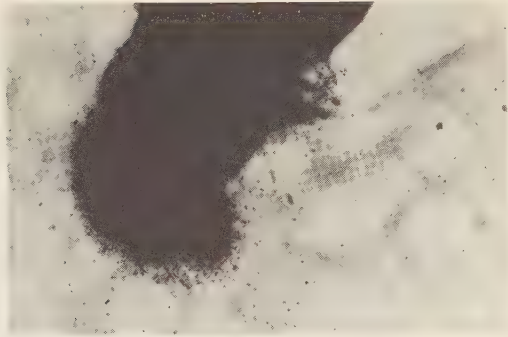


Abb. 34. Lungenkultur für die Testung von GM. Testlösung von 10 mg GM : 1 ml Lösungsmittel. Nur geringes Hervorsprießen einzelner, stark rund verbildeter Zellen an der Schnittkante. Original, 200 x



Abb. 34a. Kontrollkultur, ohne Zusatz, zeigt ein ungehemmtes Lungenepithel im Vormarsch. Original, 200 x

Versuchsserie 5: Testlösung 1 mg GM : 50 ml und 100 ml

An Testkulturen vom Kardialmuskel, Koronargefäßen und Os frontale (12 Tg) konnte an sämtlichen Testkulturen nach Einwirkung der Verdünnung von 1 mg GM : 50 ml Lösungsmittel die cytomorphologische Reaktion auf die zellfremde Substanz festgestellt werden. Das Zellbild des normalerweise dreidimensional wachsenden Fibroblasten-Gewebes hatte sich in eine epithelartige Form umgewandelt. Die mit einer hohen Proliferationspotenz ausgestatteten Osteoblasten zeigten eine sehr gute Emigration normaler Zellformen.

Explantate vom Kardialmuskel, Koronargefäßen und Os frontale wurden mit 1 gtt einer GM-Konzentration von 1 mg : 100ml Lösungsmittel in der 1. Passage angesetzt. Diese Kulturen verfügten über eine ungehemmte Proliferation der Fibroblasten. Nur wuchsen die Bindegewebszellen des Kardialmuskels als Reaktion auf die Fremdsubstanz epithelzell-artig aus und die Osteoblasten zeigten eine polymorphe Zellstruktur. Sämtliche Kontrollkulturen (ohne Zusatz) verfügten über eine sehr starke Vermehrungstendenz normaler Zellen.

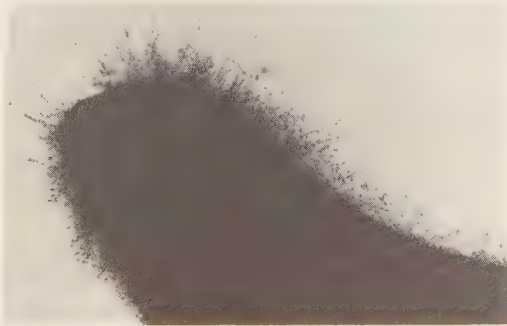


Abb. 35. Reaktion eines Kardialmuskel-Explantats (12 Tg) auf eine zellfremde Substanz. 1 mg GENTAMYCIN : 50 ml Lösungsmittel. Beachtenswerte Verzögerung der Mitose führt zu einer schmalen Proliferationszone.  
Original, 200 x





Abb. 35a. Wachstumszone der Kontrollkultur ohne Testzusatz zeigt eine normale, breite Proliferationszone. Original, 200 x

Versuchsserie 6: Testkonzentrationen von 10 mg, 20 mg und 40 mg : 1 ml Lösungsmittel

Explantate vom Kardialmuskel, Koronarien und Os frontale (8-13 Tg) wurden mit diesen drei Konzentrationen ausgetestet. Erwartungsgemäß zeigten sämtliche Kulturansätze die Zeichen eines tiefen Mitosestopps. Epithel-explantate von Lunge, Leber, Epidermis und Niere boten das gleiche Bild einer durchgreifenden Mitose-Inhibition dar. (s. Abb. 36 und 36a)

Auffallend war die Metamorphose der Bindegewebs-Explantate nach der Dotation von 1 gtt einer Lösung von 20 mg GM : 1ml physiologischer NaCl-Lösung. Nach 48 Stunden Kulturzeit hatten sich die Fibroblasten in rundzellartige Formen als

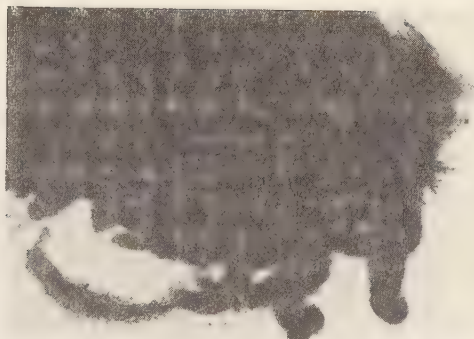


Abb. 36. Inhibierte Hautkultur, nach Dotation 1 gtt  
einer Lösung von 10 mg GM : 1 ml.  
Original, 200 x



Abb. 36a. Embryonale Haut (12 Tg) mußte nach dieser Dosis  
fast die gesamte Zellproliferation einstellen.  
10 mg GM : 1 ml. Original, 200 x

Zeichen einer Abwehrreaktion umgeformt.



Abb. 37. Koronargefäß-Kultur nach der Zuteilung 1 gtt einer Testlösung von 20 mg : 1 ml zeigt merkwürdigerweise einen mäßig-breiten Gürtel von Fibroblasten, allerdings inhibiert. Original, 200 x

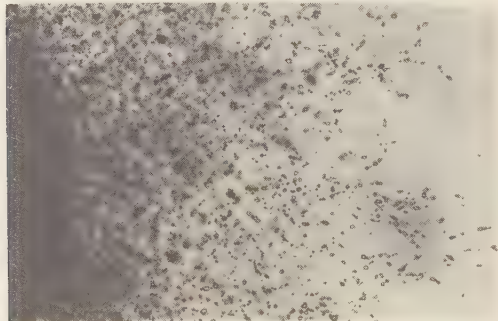


Abb. 37a. Kontrollkultur (11 Tg) mit einer breiten Wachstumszone. Original, 200 x

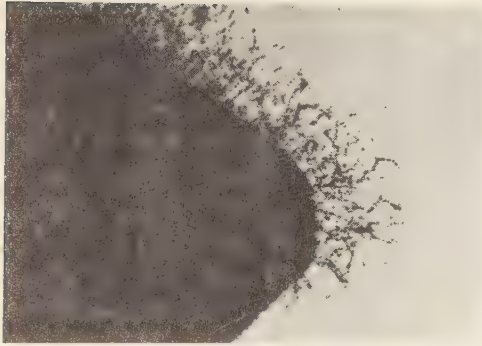


Abb. 38. Embryonaler Kardialmuskel (11 Tg). Reaktion der Herzfibroblasten mit der Testlösung von 20 mg GENTAMYCIN : 1 ml des Lösungsmittels. Starke Inhibition der Zellvermehrung. Original, 200 x

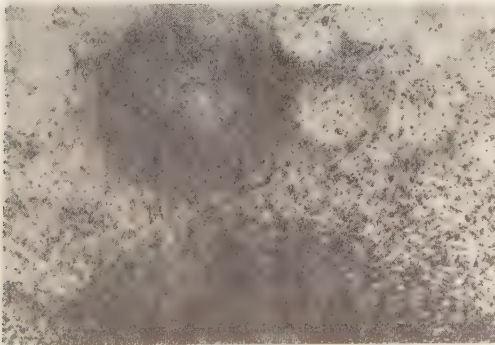


Abb. 38 a. Starke Zellproliferation bei gleichalter Kontrollkultur ohne Testzusatz. Original 200 x

Koronargefäß-Kulturen zeigten eine lockere Wachstumszone mit einzelnen prominenten Zellkonglomeraten. Aber auch hier bot sich nach 96 Stunden Kulturzeit das Bild einer starken Inhibition.

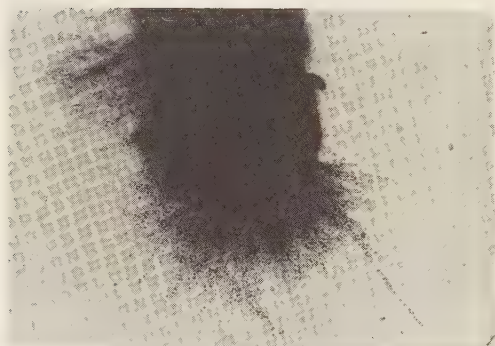


Abb. 39. 12 Tage altes Koronargefäß-Explantat als Testkultur für die Konzentrationsstufe von 10 mg GENTAMYCIN : 1 ml Lösungsmittel. Mittelstarke Hemmung mit partieller, büscheliger Emigration von Fibroblasten. Original, 200 x

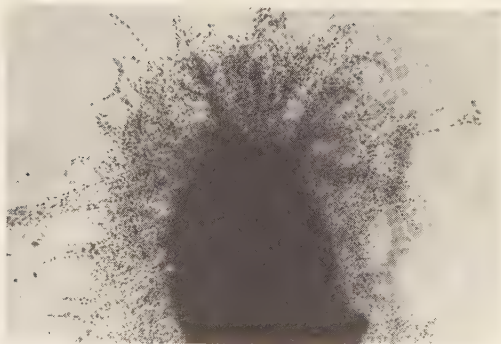


Abb. 39 a. Kontrollkultur von 12 Tage alten Koronargefäßen zeigt eine ungehemmte, ganzrandige Proliferation von Bindegewebszellen  
Original, 200 x

Die Zellvitalität der Osteoblasten ist sehr groß, und das Proliferationspotential wäre vielleicht in der Lage, die Schädigung zu überwuchern. Aber auch hier läßt die Konzentration der Proliferation kaum Platz. Die Osteoblasten stehen nicht dicht an dem Explantatrand, sondern nur büschelig oder einzeln, auffällig konfiguriert.  
(s. Abb. 40, 40a, 41, 41a, 41b)

Epithelfragmente des Darmes wurden mit 1 gtt der Testlösung von 20 mg GM : 1 ml angesetzt. Nach 2 Tagen war die primäre Wachstumspotenz zu 40 % inhibiert, während der Rest eine vorsichtige Proliferation an der Schnittkante aufwies. Dieser Zustand verwischte sich in den nächsten 24 Stunden zu einer partiellen Mitose-Inhibition mit geringer Rundzellproliferation.

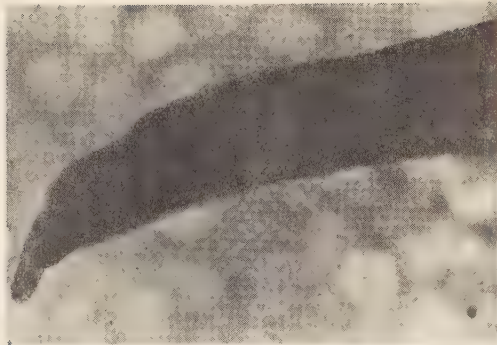


Abb. 40. Embryonales Os frontale (12 Tage) nach 3 Tagen Kultur in einem Nährmedium aus HP+EE und 1 Mikrotropfen einer Konzentration von 40 mg GENTAMYCIN : 1 ml physiologischer NaCl-Lösung. Vollständige Inhibition jeglicher mitotischer Tätigkeit. Original, 50 x



Abb. 40a. Kontrollkultur von der Spitze des embryonalen Os frontale. Starke, ungehemmte Osteoblastenproliferation, Original, 50 x



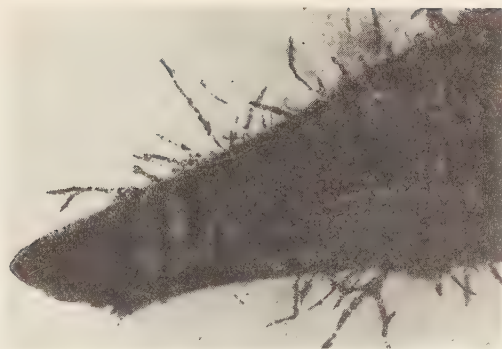


Abb. 41. Sehr starke Hemmung der Osteoblasten-Proliferation des 11 Tage alten embryonalen Os frontale durch die Testlösung von 20 mg GM : 1 ml physiol. NaCl-Lösung. Nur vereinzelte, zusammengeschmolzene, prominente "Riesen-Sammel-Osteoblasten" kennzeichnen dieses Bild einer tiefen Mitoseinhibition. Original, 200 x

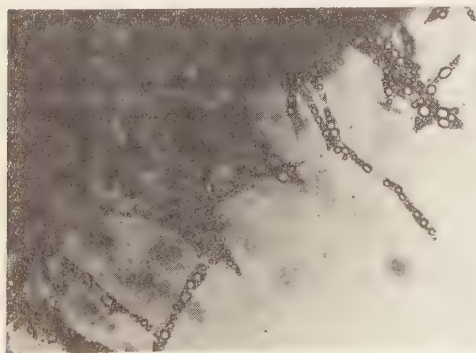


Abb. 41a. Einzelne dieser "Riesen-Sammel-Osteoblasten", angefüllt mit phagozytierter Testlösung. Starke Inhibition der Zellproliferation, Original, 500 x

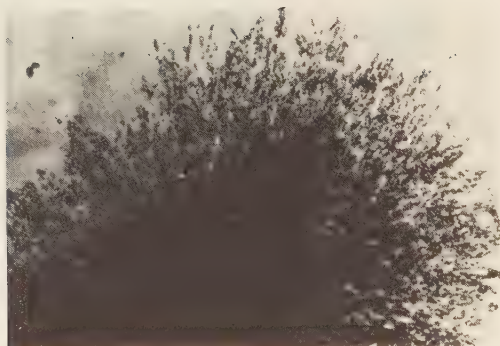


Abb. 41b. Kontrollkultur, ohne Zusatz, von der Spitze eines embryonalen Os frontale. Dichte Proliferationszone. Original, 200 x

Aus den Reaktionen dieser Versuchsreihen war zu schließen, daß hiermit die Grenzkonzentration, die noch gerade toleriert wurde, bereits erreicht war. Trotz sorgfältigster Methodik würde keine Möglichkeit bestehen, auch nur die geringste zellbiologische Reaktion bei den Explantaten zu erreichen. Daher waren die abschließenden Kulturansätze reine Routinearbeit. Bindegewebs-Explantate vom Kardialmuskel, den Koronargefäßen, dem Os frontale (9 Tg) und Darmfragmente (12-13 Tg) wurden mit 1 gtt der Testlösung von 40 mg GM : 1 ml konfrontiert. Erwartungsgemäß zeigten sämtliche 160 Kulturen keine Zellproliferation. Die Kontrollen zeigten eine ungehemmte Zellproliferation.

| Gewebe      | 1 gtt einer Lösung von<br>1 mg : ..... ml |      |       |       |       |       |      |
|-------------|-------------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|------|
|             | 1 ml                                      | 2 ml | 5 ml  | 10 ml | 20 ml | 50    | 100  |
| Kardialmk.  | +(+)                                      | + -  | +++   | +++   | +++   | ++(+) | +++  |
| Koronargef. | ++                                        | + -  | +++   | +++   | +++   | ++(+) | +++  |
| Os front.   | ++                                        | ++   | +++   | +++   | +++   | +++   | ++++ |
| Iris        | + -                                       |      |       |       |       |       |      |
| Leber       | + -                                       | --   | + - - | + + - | + + - |       |      |
| Epidermis   | + -                                       |      | - +   | - +   | - +   |       |      |
| Darm        | + -                                       | --   |       |       |       |       |      |
| Knochenmark | --                                        |      |       |       |       |       |      |
| Lunge       | --                                        |      |       |       |       |       |      |
| Milz        |                                           | ++   |       |       |       |       |      |
| Niere       | --                                        |      |       |       |       |       |      |

Tabelle 5. Wachstumstendenz der Gewebekulturen nach GENTAMYCIN-Dotation,  
nach 72 Stunden Kulturzeit

| Versuchs-<br>gruppe | Konzentrationen<br>GM : 1 ml | ggt-Konzentra-<br>tionen in $\mu\text{g}$ | Konzentrationen<br>in $\frac{\mu\text{g}}{1 \text{ mm}^3}$ Medium |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1                   | 1 mg                         | 14-16                                     | 0,03-0,04                                                         |
| 2                   | 0,5 mg                       | 10                                        | 0,02                                                              |
| 3                   | 0,2 mg                       | 3,6                                       | 0,007                                                             |
|                     | 0,1 mg                       | 1,8                                       | 0,003                                                             |
|                     | 0,05 mg                      | 0,9                                       | 0,0018                                                            |
| 4                   | 2 mg                         | 36                                        | 0,07                                                              |
|                     | 3 mg                         | 54                                        | 0,14                                                              |
|                     | 4 mg                         | 72                                        | 0,21                                                              |
|                     | 5 mg                         | 90                                        | 0,28                                                              |
| 5                   | 0,02 mg                      | 0,4                                       | 0,0008                                                            |
|                     | 0,01 mg                      | 0,2                                       | 0,0004                                                            |
| 6                   | 10 mg                        | 180                                       | 0,4                                                               |
|                     | 20 mg                        | 360                                       | 0,8                                                               |
|                     | 40 mg                        | 720                                       | 1,6                                                               |

Tabelle 6: Testkonzentrationen in den Versuchsgruppen

B. Die Wirksamkeit des GENTAMYCIN auf embryonales Nieren-Gewebe in vitro.

Gestützt auf die bisherigen Untersuchungen der Wirkung der Antibiotika, hier speziell des GENTAMYCIN, auf embryonale Gewebe, sollte nichts unversucht bleiben, auch die Zellen der Gewebe zu untersuchen, bei deren bakteriellen Infektionen ein Einsatz von GENTAMYCIN erfolgt, wobei besonders auf eine Schädigung der Substanz auf das mitbeteiligte Organgewebe nicht auszuschließen ist. Diese Sensibilität tritt bei embryonalem Nierengewebe deutlich hervor.

Material und Methodik: Nierengewebe von Hühnerembryonen mit unterschiedlicher Bebrütungsdauer werden unter sterilen Kautelen entnommen und vermittels der Plasma-Extrakt-Klotz-Technik, Wasserstoffionenkonzentration des Mediums pH = 7,2 und 37,5°C im Brutschrank kultiviert. Sofort mit dem Ansatz oder erst in der 1. Passage erhalten die Kulturen 1 Mikrotropfen der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz dotiert.

Versuchsserie 1: 1 mg GENTAMYCIN (GM) : 1 ml (R-L-Lösg.)

Nierengewebe von 12 - 13 Tage alten Hühnerembryonen wurden erst 72 Stunden lang angezüchtet, in der 1. Passage umgesetzt und mit 1 Mikrotropfen einer Lösung von 1 mg GENTAMYCIN/1 ml Ringer-Laktat-Lösung (R-L-Lösg.) dotiert. Nach 48 Stunden Kulturzeit trat eine starke Epithelproliferation, ohne Hemmeffekte, mit kleinen Lyseherden hervor. In den Epithelzellen eine starke Speicherung von stark lichtbrechenden Tröpfchen. Kontrollen normales Epithelwachstum.

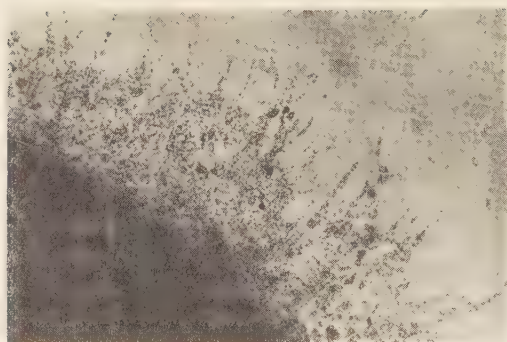


Abb. 42. Nierenkultur vom 13 Tage alten Hühnerembryo,  
1. Passage, Dotation 1 gtt GM 1 mg : 1 ml,  
Bild nach 72 Stunden Kultur.  
Original, 200 x



Abb. 42a. Nieren-Kontrollkultur, ohne Testzusatz.  
Typisches Bild einer auswachsenden Epithel-  
membran. Original, 200 x

Versuchsserie 2: 2 mg GM : 1 ml R-L-Lösung

Nierenexplantate vom 12 bzw. 16 Tage alten Hühnerembryo erhielten mit dem Ansatz 1 Mikrotröpfchen obiger Lösung. 24 Stunden nach dem Ansatz, bzw. 24 Stunden, nach der 1. Passage war an den Schnittkanten keine bzw eine ganz geringe Rundzell-Proliferation festzustellen. Nach 48 Stunden Kulturzeit hatte sich das Bild wieder verändert: Teils ganz geringe, inhibierte Zellproliferation, teils geringe Proliferation aber ausgeprägter Proteolyse und auch eine gute bis starke Proliferation. Die Kontrollen wiesen eine gute Proliferation epithelförmiger Zellen auf. Bei den 16 Tage alten Nierengewebe trat die gesamte Epithelzellproliferation zu Gunsten einiger prominenter Riesen-Sammel-Epithelzellen zurück. Eine zusammenhängende Epithelmembran bestand nicht mehr. Die Kontrollen (ohne Zusatz) ließen feinkorporierte Epithelzellen erkennen. Auffallend eine starke Proteolyse, auch sind die Epithelzellen der Kontrollen breiter. Jedoch erscheinen ein Teil der Epithelien durch die Phagozytose von Testsubstanz aufgebläht !

Auch nach einer Kulturzeit von 72 Stunden hat sich in dem Zellbild nichts geändert.

Versuchsserie 3: 5 mg GM : 1 ml R-L-Lösung

Embryonales Nierengewebe (12 Tg) erhielt mit dem Ansatz 1 Mikrotröpfchen der obigen Testlösung. Nach 48 Stunden Kulturzeit teils geringes Epithelwachstum teils nur geringe Rundzellproliferation als Ausdruck einer Abwehrfunktion. Kontrollen: gutes bis sehr gutes Wachstum von Epithelzellenverbänden. 72 Stunden nach Ansatz erscheint das Wachstum weiter inhibiert, keine Progression in den vergangenen 24 Stunden. Die Kontrollen dagegen weisen keine Inhibition auf.





Abb. 43. Nieren-Fragment (dunkler Bezirk) vom 12 Tage bebrüteten Hühnerembryo nach Zusatz eines Mikrotröpfchens der Test-Konzentration von 5 mg GENTAMYCIN : 1 ml. Sehr starke Inhibition. Nur vereinzelte hervorsprossende Epithelzellen an der Schnittkante. Original, 200 x



Abb. 43a. Nierenkultur ohne Testzusatz zeigt das typische Bild einer Epithelwachstumszone. Original, 200 x

Versuchsserie 4: 1 mg GM : 10 ml R-L-Lösung

Nierenepithel (12 Tg) wurde mit der Testlösung inkubiert, und bereits nach 48 Stunden Kultur weist sie eine sehr geringe Proliferation aus, die aber schon durch proteolytische Prozesse lysiert wurde, nur ein ganz geringes sekundäres Wachstum. Nach 72 Stunden verhindert die starke Lyse eine Restitution des Epithels. Einzelne Epithelspitzen wachsen aus dem Explantat aus, nekrotisierte Blutzellen liegen im Raum herum. Neubildung von Epithelien. Kontrollen: zeigen ein progressives Epithelwachstum, das von Lyseherden unterbrochen wird. Nach 96 Stunden löst die starke Lyse das Explantat aus dem Medium heraus. Keine Membran entwickelt, nur einzelne Zellhäufchen, Lyse der Proliferationszone. Kontrollen: keine Veränderung.

Versuchsserie 5: 1 mg GM : 20 ml R-L-Lösung

Ansatz von Nierengewebe vom 12 - 13 Tage alten Hühnerembryo. Mit dem Ansatz gab es die Testlösung zu dem Medium. Nach 24 Stunden war eine starke Proteolyse auffallend. An der Schnittkante nur eine Unruhe mit einzelnen Zellspitzen. Nach 72 Stunden erste Zellspitzen, die aber bald wieder der Nekrose im Gefolge einer sehr ausgeprägten Proteolyse zum Opfer fallen, denn von der Substanz oder ihren Metaboliten geht eine zytotoxische Wirkung aus.

Versuchsserie 6: 1 mg GM : 30 ml R-L-Lösung

Nierengewebe (12 Tg) wies nach 48 Stunden Kulturzeit eine auffallend starke Proteolyse auf, während die Kontrollen keine Lyse aufzeigten. Nur eine geringe Rundzellproliferation an der Schnittkante, aber keine ausgeprägte Wachstumszone, alles fermentativ zerstört.

Versuchsserie 7: 1 mg GM : 2 ml R-L-Lösung

Die Testgewebe zeigen nach der Dotation mit dieser konzen-

trierten Lösung nur eine gewisse Unruhe an der Schnittkante, aber keine echte Proliferation von Zellen. Dieser Zustand wird nicht etwa gebessert sondern durch die zytotoxische Wirkung des GENTAMYCIN nur noch verschlechtert: Die etwa bestandenen neuen Wachstumsspitzen fallen der toxischen Lyse zum Opfer, es schwimmen Zell- und Gewebefragmente in der Kultur umher.



Abb. 44. Nierenkultur (12 Tg) nach Einwirkung  
1 gtt einer GM-Lösung von 1 mg : 2 ml  
Lösungsmittel. Inhibierte Zellprolifera-  
tion.  
Original, 200 x

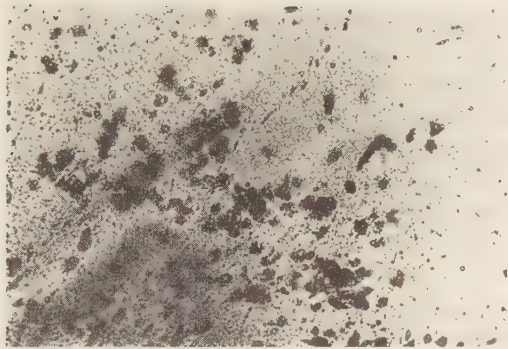


Abb. 44a. Nieren-Kontrollkultur (12 Tg) nach  
72 Stunden Kulturzeit. Ungehemmte  
Proliferation von Nierenzellen.  
Original, 450 x

Versuchsserie 8: 1 mg GENTAMYCIN : 5 ml/30 ml/50 ml/  
100 ml/150 ml  
Lösungsmittel

Nierengewebe (12 Tg) 24 Stunden nach Ansatz:

- 1 : 5 - Rundzellproliferation
- 1 : 30 - Ebenfalls Rundzellproliferation
- 1 : 50 - Unruhe an der Schnittkante
- 1 : 100 - Unruhe an der Schnittkante
- 1 : 150 - Unruhe an der Schnittkante

Kontrolle , ohne Zusatz zeigen erste Epithelzellproliferation.

Nach 4 Tagen Kulturzeit:

- 1 : 5 - Ein Saum von Epithelzellen zieht sich um das  
Explantat herum, in keinem geschlossenen Ver-  
band, sondern teils flottierend, teils zu Zell-  
häufchen festsitzend.
- 1 : 30 - Auch hier Zellhäufchen und frei herumschwimmen-  
de Zellen und Zellfragmente.

- 1 : 50 - Keine Proliferation von Zellen, Inhibition, nur flottierende Zellen aus der Zeit vor dem Einsetzen der Zytostase.
- 1 : 100 - Auch hier noch ein breiter Saum von flottierenden Zellen mit keinem Zusammenhang.
- 1 : 150 - Breiter Saum flottierender aber auch in "monolayer"-art festsitzender Epithelzellen.

Kontrollen zeigen das Bild der Epithelmembranen ohne Zerstörung.

Versuchsserie 9: 1 mg GENTAMYCIN : 5 ml/30 ml/50 ml/100 ml/  
200 ml Lösungsmittel

Das Nierengewebe (12 Tg) erhielt mit dem Ansatz die Testdotation. Nach 24 Stunden Kulturzeit ergab sich folgendes zytomorphologisches Bild:

- a) 1 mg : 5 ml : Starke Lyse des Mediums, erste Epithelzellsitzen
- b) 1 mg : 30 ml : Ausstoß von rundzelligen Elementen
- c) 1 mg : 50 ml : Rundzellproliferation
- d) 1 mg : 100 ml : Erste Epithelsitzen wahrnehmbar
- e) 1 mg : 200 ml : Viele Epithelzellen schwimmen in der Nähe des Explantats

Nach 72 Stunden Kulturzeit:

- a) Geringes bis mäßig-gutes Epithelwachstum
- b) Geringe Rundzellproliferation, z.Teil auch gutes bis sehr gutes Epithelzellwachstum
- c) Teils nur Rundzellproliferation und auch gute Proliferation.
- d) Gute bis mäßige Rundzellproliferation deutet noch auf eine zytotoxische Inhibition
- e) Gute bis mäßige Zellvermehrung zeigt die Grenze an.

Versuchsserie 10: 20 mg GENTAMYCIN : 1 ml R-L-Lösung

Nierengewebe vom 12 Tage alten Hühnerembryo erhielt ein Tröpfchen obiger Testlösung zum Ansatz dotiert. Sowohl nach

24, nach 48 als auch nach 72 Stunden das gleiche Bild:  
Keine Zellproliferation. Die Kontrollen zeigten das typische Bild einer guten Epithelproliferation ohne Hemmung.

Konzentration  
 der Testlösung  
 GENTAMYCIN

Nierengewebs-Proliferation

---

|         |        |                                                            |
|---------|--------|------------------------------------------------------------|
| 1 mg :  | 1 ml   | Gutes Nierenepithel-Wachstum                               |
| 2 mg :  | 1 ml   | 75 % inhibiert, 25 % Proliferation                         |
| 5 mg :  | 1 ml   | 80 % inhibiert, 20 % Proliferation                         |
| 1 mg :  | 1 ml   | Gutes Nierenepithel-Wachstum                               |
| 1 mg :  | 20 ml  | Starke Zytolyse, geringe Proliferation                     |
| 1 mg :  | 30 ml  | Starke Zytolyse, geringe Proliferation                     |
| 1 mg :  | 2 ml   | Gutes Wachstum, aber starke Lyse                           |
| 1 mg :  | 5 ml   | Rundzellproliferation und Epithelzellspitzen               |
| 1 mg :  | 30 ml  | Rundzellproliferation                                      |
| 1 mg :  | 50 ml  | Unruhe an der Schnittkante, Rundzellen                     |
| 1 mg :  | 100 ml | Epithelzellproliferation                                   |
| 1 mg :  | 150 ml | Breiter Saum von "monolayer" und losgelösten Epithelzellen |
| 20 mg : | 1 ml   | Vollständige Inhibition                                    |

---

Tabelle 7: Proliferationstendenz von embryonalem  
 Nieren-Gewebe nach GENTAMYCIN-Dotation

C. Die Wirkung des GENTAMYCIN auf embryonale Hautgewebe

Auch die Haut, ein Organ, das die Schutzfunktion für den Organismus erfüllt, den sie umhüllt, besitzt einen organotypischen Stoffwechsel, die Fähigkeit zu atmen und Stoffe auszutauschen, reagiert auf zellfremde Substanzen mit einer für sie zytologisch-typischen Weise.

Material und Methodik: Embryonales Hautgewebe von 9 - 12 Tage alten Hühnerembryonen wurde mittels der Plasma-Extrakt-Gel-Methode kultiviert und sofort oder erst in der 1. Passage mit 1 Mikrotröpfchen der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz angesetzt. Wasserstoffionenkonzentration des Mediums pH 7,2 - 7,4, Bebrütung bei 37,5°C.

Versuchsserie 1: 10 mg : 1 ml R-L-Lösung

Bei Ansatz von ausgesprochenen Epithelgeweben der Lunge, der Leber, der Niere wurde auch Haut (12 Tg) zum Ansatz gebracht und mit einem Mikrotröpfchen obiger Lösung konfrontiert.

Nach 24 Stunden Kulturzeit konnte bei sämtlichen Kulturen und speziell bei der Haut keine Proliferation eruiert werden.

Nach 72 Stunden keine Progression, totale Inhibition.

Versuchsserie 2: 5 mg : 1 ml R-L-Lösung

Die gleichen Epithelgewebe wurden mit einer geringeren Konzentration angesetzt und zeigten, besonders an der Haut, nach 24 Stunden Kultur keine Zellproliferation, während die unbehandelten Kontrollen eine gute Zellemigration aufwiesen.

Nach 72 Stunden wurde eine beginnende aber gehemmte Proliferation festgestellt, wogegen die Kontrollen ein ungehemmtes gutes Wachstum zeigte.



Versuchsserie 3: 1 mg : 5 ml/ 10 ml/ 20 ml R-L-Lösung

Epithelgewebe der Haut vom 9 Tage alten Hühnerembryo wurden mit den Testlösungen konfrontiert. Nach 72 Stunden Kulturzeit konnte bei sämtlichen Konzentrationen ein gutes bis sehr gutes Wachstum des Epithels bei den Testkulturen und den Kontrollen festgestellt werden. Dieses Bild blieb auch über eine verlängerte Kulturzeit hinaus erhalten.

Versuchsserie 4: 1 mg GM : 1 ml R-L-Lösung

Haut vom 9 Tage alten Hühnerembryo erhielt in der 1. Passage 1 Mikrotröpfchen mit 0,016 mg GM je Kultur, bei ungefähr  $10^4$  Zellen je Explantat wären das 0,000 001 mg je Zelle! Nach 48 Stunden Kulturzeit gab es bei der Haut eine starke Proteolyse als Abwehrreaktion und ein mäßiges Wachstum bei allen Kulturen. Die Kontrollen (ohne Zusatz) zeigten ein sehr gutes Wachstum von Hautepithelien, ohne jegliche Inhibition.

Nach 72 Stunden hatte sich das Bild insofern gewandelt, als die primäre Wachstumszone bis auf einen dünnen Rand lysiert war, aber von dem Explantat her aus tieferen nicht so stark geschädigten Gewebebereichen neue Zellen einwanderten und den Bereich der ursprünglichen primären Wachstumszone wieder auffüllten.

Sämtliche Kulturen wiesen das Bild einer mäßigen Zellwucherung auf.

Versuchsserie 5: 1 mg GM : 2 ml R-L-Lösung

Haut (12 Tg) erhielt mit dem Ansatz einen Testzusatz der obigen Lösung, und es konnten nach 24 Stunden Kulturzeit lediglich eine anfängliche Rundzellproliferation an den Schnittkanten festgehalten werden. In den folgenden 24 Stunden entstand aus dieser anfänglichen Erscheinungsform dann das Bild einer mäßig-guten Epithelzellproliferation mit einer geringen Lyse des Mediums.

Nach weiteren 24 Stunden (insgesamt 72 Stunden) hatte sich das Zellbild wieder gewandelt, jetzt konnte eine sehr gute, fast als stimuliert anzusehende, Epithelzellwucherung festgehalten werden, wogegen das Wachstum der Kontrollen nicht ganz so stark ausfiel.

Versuchsserie 6:

- a) 2 mg GM : 1 ml Lösungsmittel
- b) 3 mg GM : 1 ml Lösungsmittel
- c) 4 mg GM : 1 ml Lösungsmittel
- d) 5 mg GM : 1 ml Lösungsmittel
- e) 10 mg GM : 1 ml Lösungsmittel

Hautexplantate (12 Tg) zeigten nach 24 Stunden Kulturzeit mit den angegebenen Lösungen als überwiegenden Eindruck nur eine starke Lyse des Mediums. Nach 48 Stunden konnte das erste Bild weiter aufrechterhalten werden, aber mit Zunahme der Konzentration nahm die Proliferation von Zellelementen immer mehr ab.

Nach 96 Stunden Kultur ergab sich folgendes Zellbild:

- a) Mäßig gute Proliferation, aber Lyse der Wachstumszone
- b) Geringe Zellwucherungen, starke Lyse, Inhibition
- c) Lyse, keine Proliferation, nur einzelne prominente Zellen, inhibiert erscheinendes Proliferationsbild
- d) Kulturen erscheinen inhibiert
- e) Auffallend geringe Proliferation von Rundzellen, keine Epithelzelelemente

Bei sämtlichen Testkulturen entstand der Eindruck einer profunden Inhibition. Die Kontrollen zeigten dagegen das gewohnte Bild einer ungehemmten Zellproliferation.

Versuchsserie 7: 1 mg GM : 50 ml/ 100 ml/ 200 ml

Kopfhaut (12 Tg) wurde unter sterilen Kautelen explantiert und mit 1 Mikrotropfen der obigen Lösungen versehen zur Deckglaskultur implantiert. Nach 24 Stunden hatte sich nur wenig geändert: eine starke Mediumslyse und vereinzelte Zellen an der Schnittkante.

Nach 72 Stunde ein vollkommen anderes Bild:

- 1 mg : 50 ml: Auflösung der Federkapillaren, trotzdem gute Zellproliferation der Haut-epithelien  
Kontrollen: sehr starke Zellproliferation.
- 1 mg : 100 ml: Gute Proliferation von Hautzelelementen  
Kontrolle: wie oben.
- 1 mg : 200 ml: Ebenfalls eine gute, fast stimulierte Zellemigration vom Explantat in Richtung auf die Peripherie.  
Kontrollen: Gute Zellemigration.



Abb. 45. Haut vom embryonalen Huhn (12 Tage) nach Dotation von 1 mg GM : 50 ml Lösungsmittel. Das Antibiotikum löste einen permanenten Zerfall der Federfollikel aus.  
Original, 200 x



Abb. 45 a. Hautexplantat (12 Tage) 3 Tage nach Gabe 1 gtt einer Lösung von 1 mg GM : 1 ml Lösungsmittel. Mittelmäßig, noch gehemmte Zellproliferation. Original, 200 x



Abb. 45 b. Vergrößerung der Federfollikel. Original, 450 x

Versuchsserie 8: 20 mg GM : 1 ml R-L-Lösung

Haut (12 Tg) wurde lege artis mit einem Mikrotröpfchen dieser starken Konzentrationsstufe angesetzt, und es zeigte sich, wie zu erwarten war, nicht die geringste Zellspitze über die gesamte Kulturzeit von 96 Stunden. Das Medium veränderte sich durch die Konzentration zum Bild einer inneren Milieuverschiebung, keine Infektion! Die Kontrollen bleiben klar. Sehr starke Zellproliferation mit typischer Lyse.

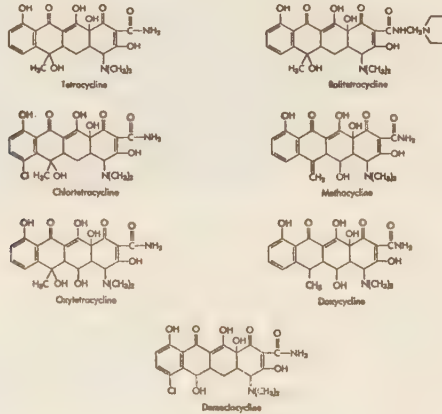
| Konzentration<br>der Testlsg. | Zellwachstums-Reaktion<br>nach GENTAMYCIN             |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 10 mg : 1 ml                  | Vollständige Proliferations-Inhibition                |
| 5 mg : 1 ml                   | Inhibition                                            |
| 1 mg : 5 ml                   | Gute Zellproliferation                                |
| 1 mg : 10 ml                  | Gute Zellproliferation                                |
| 1 mg : 20 ml                  | Sehr gute Zellproliferation                           |
| 1 mg : 1 ml                   | Mäßige Proliferation, sekundäres<br>Wachstum          |
| 1 mg : 2 ml                   | Anfänglich mäßig-gute Proliferation,<br>wird sehr gut |
| 2 mg : 1 ml                   | Mäßig-gute Proliferation                              |
| 3 mg : 1 ml                   | Geringe Proliferation-Stase-Inhibition                |
| 4 mg : 1 ml                   | Inhibition                                            |
| 5 mg : 1 ml                   | Inhibition                                            |
| 10 mg : 1 ml                  | Inhibition                                            |
| 1 mg : 50 ml                  | Gute Proliferation                                    |
| 1 mg : 100 ml                 | Gute Epithel- und Fibroblasten-Pro-<br>liferation     |
| 1 mg : 200 ml                 | Stimulierte Zellproliferation                         |
| 20 mg : 1 ml                  | Vollständige Inhibition                               |

Tabelle 8: Reaktion von Hautexplantaten auf GENTAMYCIN

Versuchsgruppe V

TETRACYCLINE

Neben den vorgenannten Antibiotika haben die TETRACYCLINE wohl einen noch umfassenderen Wirkungsbereich für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten von Mensch und Tier.

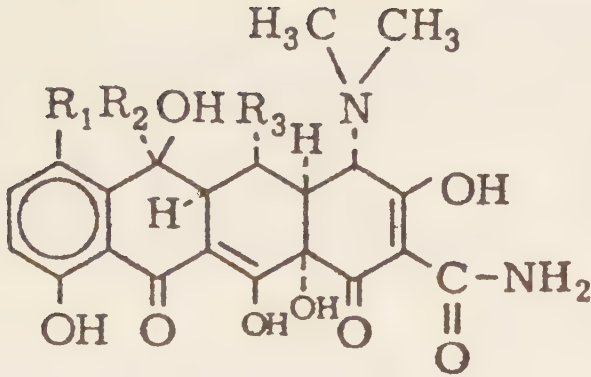


F. 10: Formeln der TETRACYCLINE

Sie sollten daher in ihrer gesamten Wirkungsbreite auf embryonale Gewebe hier angeführt werden.

A. TETRACYCLIN-hydrochlorid / Versuchs-Substanz 'Hoechst'  
TETRACYCLIN-HCl und Charge 41 40 044  
"Hostacyclin" Hoechst

(s. Basisformel der TETRACYCLINE, S. 101)



Basis-Formel der TETRACYCLINE

|             | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>    | R <sub>3</sub> |
|-------------|----------------|-------------------|----------------|
| Achro       | - H            | - CH <sub>3</sub> | - H            |
| Achromycin  |                |                   |                |
| Hostacyclin |                |                   |                |
| Tetracyn    |                |                   |                |

#### Versuchsserie 1:

Explantate des Kardialmuskels (8 - 9 Tg) wurden mit 0,025 mg des TETRACYCLIN-Hydrochlorids "HOSTACYCLIN" konfrontiert. Während die Kulturen vom 8. Bebrütungstag eine gehemmte, epithelförmige, sistierende Fibroblasten-emigration zeigten, die auch über 4 weitere Tage Kulturzeit erhalten blieb, ließen die Explantate vom 9. Bebrütungstag nach der Dotation zu 75 % eine Inhibition der Zellproliferation und zu 25 % eine geringe Emigration erkennen. Diese Zellmorphie blieb über weitere 3 Tage erhalten.



### Versuchsserie 2:

Koronargefäß-Explantate (11 Tg) erhielten mit dem Ansatz einen Zusatz von 2,5 µg HOSTACYCLIN. Nach 24 Stunden Kulturzeit konnte eine vorsichtig beginnende feinfaserige Proliferation von Fibroblasten festgestellt werden, die aber nach 96 Stunden als Ausdruck einer mäßigen Hemmung keine Progression zeigte. Die unbehandelten Kontrollen zeigten das Bild einer ungehemmten Proliferation.

### Versuchsserie 3:

Epidermis-Explantate (8-9 Tg) wurden in der 1. Passage mit 25 µg HOSTACYCLIN konfrontiert. Sie zeigten nach 24 Stunden eine auffallend starke Proteolyse des Mediums und eine verzögerte Zellproliferation. Binde- und Epithelgewebe der Kontrollen wiesen eine gute Zellemigration aus.

### Versuchsserie 4:

Kardialmuskel- und Epidermis-Explantate (8 Tg) wurden im Zustand höchster Zytodifferenzierung mit 1 gtt von 0,05 ml einer Lösung von 100 mg HOSTACYCLIN : 100 ml physiologischer Lösung nach TYRODE behandelt, und Koronargefäße, Kardialmuskel und Darm (9 Tg) erhielten die gleiche Gabe der Testsubstanz. Sämtliche Kulturen konnten unter der Antibiotikagabe keine guten Zellbilder geben, da das Antibiotikum mit den Nukleinsäuren der Zellen eine unlösliche Verbindung eingeht, die eine Proliferation inhibiert.

### Versuchsserie 5:

Koronargefäß- und Darmexplantate (11 Tg) erhielten 1 gtt einer Lösung von 0,01 mg/1 ml entsprechend 0,2 µg. Hier erwies sich die Gabe als ein Hemmfaktor, der aber überwunden werden konnte. Besonders die hohe Vermehrungspotenz des Koronargefäßgewebes überwand eine anfängliche Hemmung mit neuem Zuwachs.

Versuchsserie 6:

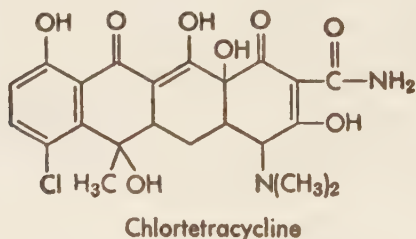
Kardialmuskel-, Koronargefäß-, Darm- und Haut-Explantate (8 Tg) wurden lege artis in einem Medium, dem in der 1. Passage 0,25 ml einer Lösung von 100 mg HOSTACYCLIN : 100 ml physiologische Lösung zugesetzt wurde, kultiviert. Sämtliche Explantate ließen das Bild einer profunden Inhibition erkennen, die auch durch Umsetzen in ein neues Medium nach vorherigem langfristigem Auswaschen nicht gelöst werden konnte.

| Testgewebe           | 1 gtt-Konzentration TC-Cl "HOSTACYCLIN" |                     |                    |                              |
|----------------------|-----------------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------------|
|                      | 0,025 mg                                | 2,5 µg              | 25 µg              | 0,2 µg                       |
| Kardialmusk.<br>(8)  | Inhib.                                  |                     |                    |                              |
| Kardialmusk.<br>(9)  | 75% Inhib:<br>25% g.Pr.                 |                     |                    |                              |
| Kardialmusk.<br>(12) | Inhib.                                  |                     |                    |                              |
| Koronargef.          |                                         | sist.mäß.<br>Inhib. |                    |                              |
| Epidermis            |                                         |                     | verzög.<br>Prolif. |                              |
| Epidermis<br>(8)     | Inhib.                                  |                     |                    |                              |
| Koronargef.          | Inhib.                                  |                     |                    | Stase, verzög.<br>Prolif.    |
| Darm                 | Inhib.                                  |                     |                    | Stase,<br>verzög.<br>Prolif. |

Tabelle 9: Reaktion embryonaler Gewebe nach TETRACYCLIN-Hydrochlorid-Dotation

Versuchsgruppe V/1 A: TETRACYCLIN-Hydrochlorid

"TETRACYN" - Pfizer - Charge 9196



Formel "TETRACYN"

Versuchsserie 1:

Wurde Narbengewebe vom Menschen in der 1. Passage mit 1 Mikrotropfen einer Lösung von 20 mg TETRACYN : 20 ml Lösungsmittel angesetzt, so gab es nach 4 Tagen Kulturzeit das typische Bild einer profunden Inhibition mit geringer Zellproliferation.

## Versuchsserie 2:

Epidermis vom Huhn (9 Tg) wurde mit der gleichen Dosis angesetzt und ergab nach insgesamt 4 Tagen Kultur eine starke, kaum inhibierte Zellemigration vom Explantat in die Peripherie. Die Wachstumspotenz war so stark, daß es keinen Unterschied zwischen Testkulturen und Kontrollen gab.

Wurde dagegen die gleich-alte Haut vom Huhn einer Konzentration von 20 mg : 10 ml gegenübergestellt, so versagte die Vermehrungspotenz eindeutig, während die Kontrollen ein ungehemmtes Wachstum darbieten.

### Versuchsserie 3:

Die Konzentration von 1 mg TETRACYN/ 1 ml Lösungsmittel bringt auch embryonalen Kardialmuskel-, Leber- und Magen-Gewebe (9 Tg) keine Möglichkeit, eine Proliferation zu erzeugen. Vollständige Inhibition.

### Versuchsserie 4:

Os frontale und Koronargefäße (12 Tg) wurden nach gewohnter Weise mit der Konzentration 20 mg TETRACYN : 10 ml Lösungsmittel konfrontiert. Beim Stirnbein trat eine fast vollständige Inhibition jeglicher Zellvitalität ein, nur einige Zellperlen an den Os frontale-Kanten  
Die Koronargefäße wiesen eine totale Hemmung ihrer Zellvitalität auf.

### Versuchsserie 5:

Wurde Haut (12 Tg) mit den Lösungen 20 : 10 und 20 : 5 angesetzt, so ergab sich die Ausfällung eines braunen Metaboliten. Mäßige Inhibition. Kontrollen: Sehr gute Proliferation.

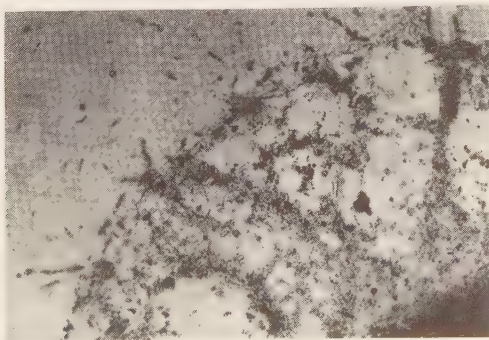


Abb. 46 . Hautfragment (12 Tg) nach Zugabe von 20 mg OTC : 5 ml physiolog. Lösungsmittel. Gehemmte Epithelproliferation mit beginnender Lyse der mittleren Zellbereiche. Original, 200 x

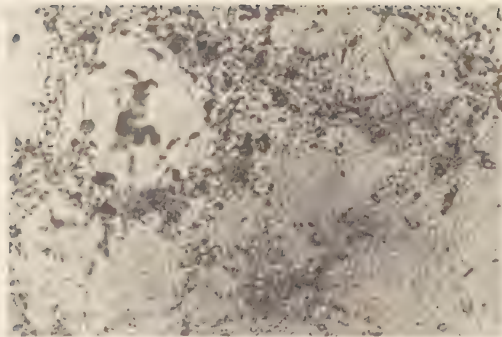


Abb. 46 a. Vergrößerung der äußeren Wachstumsrandzone  
Original, 500 x

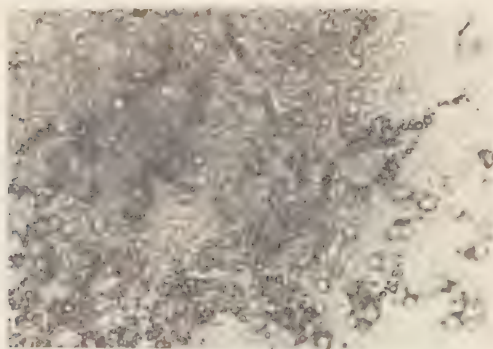


Abb. 46 b. Wachstumsrandzone einer Kontrollkultur,  
mehr gleichmäßige Emigration vom Explantat  
in die Peripherie.  
Original, 500 x

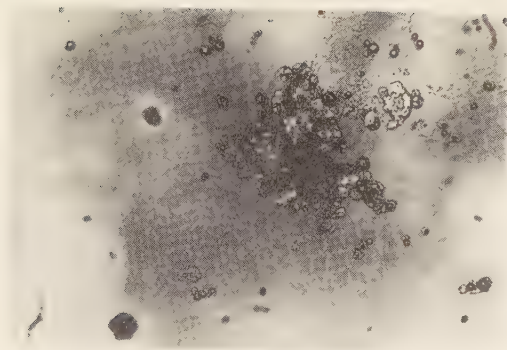


Abb. 47. Zellhäufchen von Zellen der embryonalen Epidermis nach Dotation 1 Mikrotröpfchens der Lösung 20 mg : 5 ml Lösungsmittel. Stark lichtbrechende, gespeicherte Testlösung. Original, 500 x

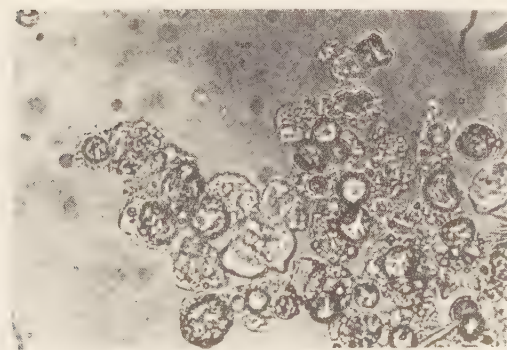


Abb. 47a. Vergrößerung von Abb. 47 weist auf  
des OTC auf das Plasma hin. Original, 2000 x

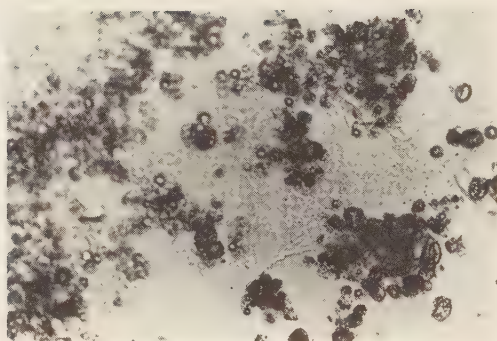


Abb. 48. Hautfragment (9 Tg) nach Dotation 1 gtt einer Testlösung von 20 mg OTC : 10 ml Lösungsmittel. Wachstumszone durch fermentative Einwirkung zerstört, nur einzelne Zellhaufen. Original, 450 x

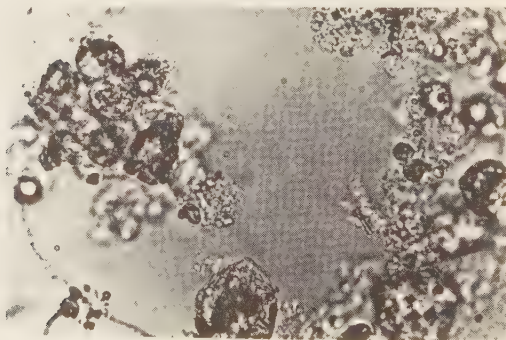


Abb. 48 a. Vergrößerung des vorherigen Bildes weist auf eine Denaturierung des Zytoplasmas in den Zellen durch OTC-Einwirkung hin. Original, 2000 x



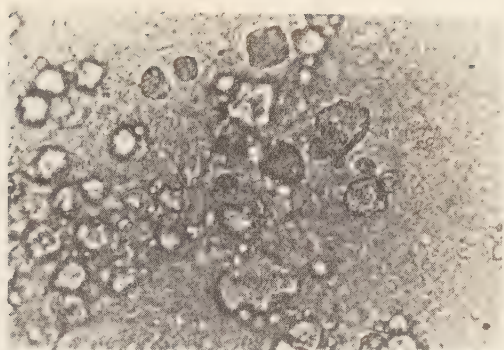


Abb. 49. Epithelzellen der embryonalen Haut nach Einwirkungen des OXYTETRACYCLINS "TETRACYN". Der Zellturgor hat nachgelassen, die Zellen beginnen zu schrumpfen. Einige Zellen fast leer, das Zytoplasma hat die Membran gesprengt und ist ausgetreten. Original, 2000 x

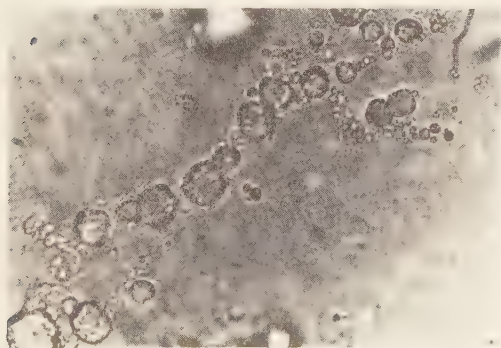


Abb. 49a. Schrumpfung von Zellen, die mit OTC behandelt wurden  
Original, 2000 x

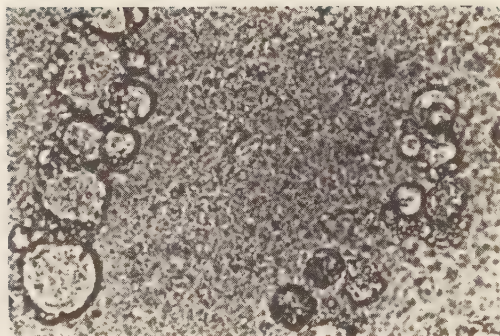


Abb. 49 b. Zellinhalt macht einen krümeligen Eindruck.  
Original, 2000 x

| Testgewebe         | TETRACYCLIN-Hydrochlorid Konzentrationen |                        | "TETRACYN" - |
|--------------------|------------------------------------------|------------------------|--------------|
|                    | 1 mg/1 ml                                | 2 mg/1ml               | 4 mg/1 ml    |
| Kardial-<br>muskel | Inhibition                               | Inhibition             | Inhibition   |
| Koronar-<br>gefäße | mäßige Inhibi-<br>tion                   | Inhibition             | Inhibition   |
| Os frontale        | Hemmung                                  | Inhibition             | Inhibition   |
| Epidermis          | starke Pro-<br>liferation                | maßige In-<br>hibition | Inhibition   |
| Leber              | Inhibition                               | - - -                  | - - -        |
| Magen              | Inhibition                               | - - -                  | - - -        |

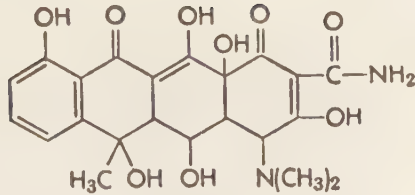
Tabelle 10: Gewebereaktion auf "TETRACYN"-Gaben

2. OXYTETRACYCLIN

TERRAMYCIN "Pfizer"

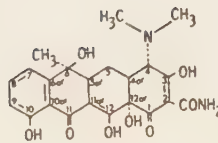
Charge 9105

Charge 8786

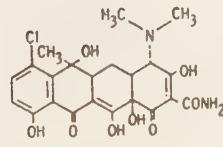


Oxytetracycline

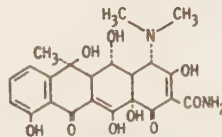
Formel des OXYTETRACYCLINS



Tetracyclin



Chlortetracyclin



Oxytetracyclin

igsten

Formeln der drei wichtigsten TETRACYCLINE

Aus: T.J.FRANKLIN and G.A. SNOW

Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,

1973

Versuchsserie 1:

Haut (9 Tg) wurde im Medium mit 1 Mikrotropfen einer Lösung von 20 mg TERRAMYCIN : 20 ml physiologischer Lösung versetzt. Nach 4 Tagen Kulturzeit zeigte sich eine geringe, stark inhibierte Fibroblasten-Proliferation und eine gute, sich verschiebende Epithelproliferation.

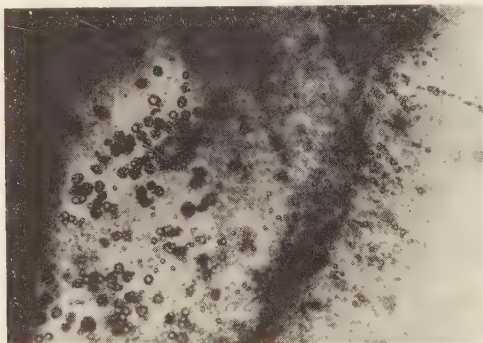


Abb 50. Haut (9 Tg) nach Gabe eines Mikrotropfens einer Lösung von 20 mg OTC : 20 ml Lösungsm. Rand einer Wachstumszone, deren mittlere Zone lysiert ist. Nachwuchs von dem Explantat her in monolayer-Form. Original, 500 x

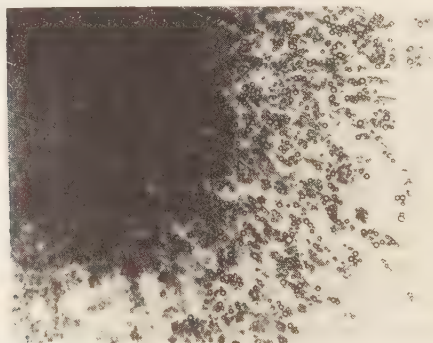


Abb. 50 a. Kontrollkultur mit sehr guter Zellproliferation  
Original, 500 x

Versuchsserie 2:

Kopfhaut (12 Tg) wurde mit der gleichen Lösung des Antibiotikums (OTC) konfrontiert. Hier zeigte sich eine mäßig-gute kaum inhibierte Proliferation an der Schnittkante, verbunden mit starker Proteolyse des Mediums. Dieser Eindruck blieb auch über eine verlängerte Kulturzeit erhalten. Die Kontrollen wiesen eine ungehemmte Proliferation auf.



Abb. 51. Kopfhaut eines Hühnerembryos ( 9 Tg) wurde einer Testlösung von 20 mg : 20 ml Lösungsmittel ausgesetzt. Nach 4 Tagen Kulturzeit eine starke, kaum inhibierte Zellemigration vom Explantat zur Peripherie.  
Original, 450 x

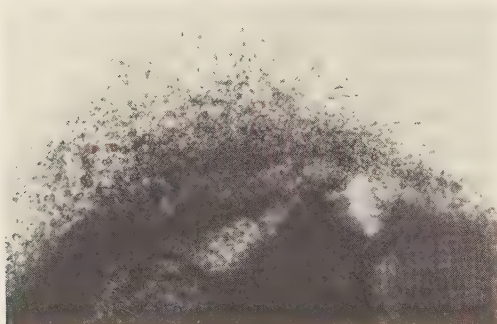


Abb. 51 a. Kaum ein Unterschied im Proliferationsbild  
zwischen Testkultur und Kontrolle  
Original, 450 x

### Versuchsserie 3:

Narbengewebe von einem Ulcus cruris am rechten Unterschenkel einer Patientin E.F., 69 Jahre alt, Station 26, wurde in einem Medium, das von der Zusammensetzung für embryonale Gewebe dadurch abweicht, als zusätzlich Ascitic fluid zugesetzt wird, erhielt in der 1. Passage 1 Mikrotröpfchen der Lösung von TERRAMYCIN 20 mg : 20 ml Lösungsmittel. Nach 4 Tagen Kulturzeit trat eine gute Proliferation runder Zellen auf, die stark lichtbrechende Körper (phagozytiertes TERRAMYCIN) enthalten. Nach weiteren 5 Tagen setzt sich die gute Proliferation fort, aber die Explantate sind dunkel pigmentiert, was auf eine Speicherung von Metaboliten des TERRAMYCINS schließen läßt, während die Kontrollen hell bleiben.



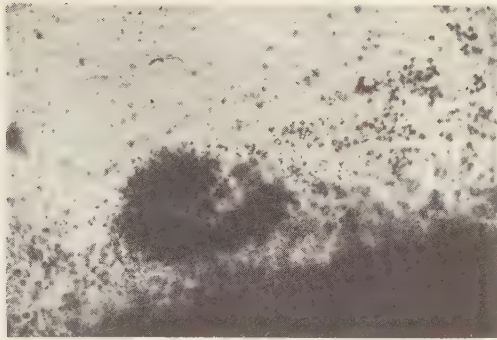


Abb. 52. Die Konzentration von 1 mg OTC : 1 ml physiolog. Lösungsmittel wirkt auf das Leberfragment sehr stark inhibierend. Keine Bildung einer Epithelmembran möglich, nur Emigration von einzelnen Zellen und Konglomerierung von Zellhaufen. Original, 450 x

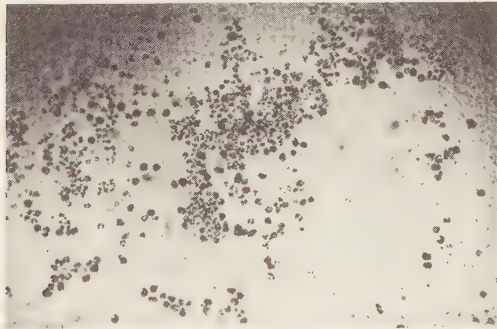


Abb. 52a. Magenexplantat mit der gleichen Lösung behandelt. Rundzellemigration deutet auf toxische Einwirkung. Original, 450 x



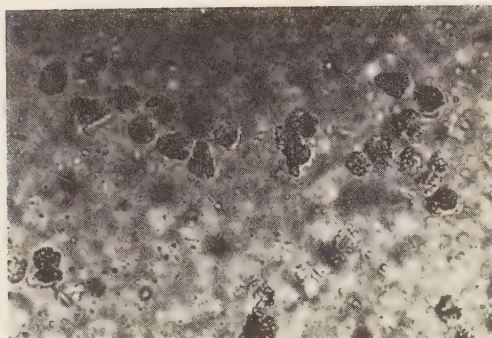


Abb. 52 b. Dieses Bild zeigt die Morphe der vermeintlichen Rundzellen. Durch die Schrumpfung und den Austritt des Zytoplasmas werden die Zellen kleiner, das Plasma wird konzentrierter und dunkler. Toxische Nekrose.  
Original, 2000 x

#### Versuchsserie 4:

Menschenhaut und TETRACYCLINE: Narbengewebe von Ulcus cruris rechter Unterschenkel, Patientin G.N., 56 Jahre alt, Station 26. Nach Implantation zeigte das Gewebe eine Chloräthylschädigung. Tiefer gelegene Zellschichten wiesen eine vorsichtige Zellproliferation auf. Nach Dotation in der 1. Passage konnte auch hier nur eine geringe Vitalität von wenigen Zellen eruiert werden.

#### Versuchsserie 5:

Menschenhaut von Narbengewebe von Ulcus cruris, linker Knöchel, innen, Patientin E.W., 67 Jahre alt, Station 26. Narbengewebe vom rechten Oberschenkel des Patienten F.L., Station 26. Granulationsgewebe vom Bauch nach Heizkissen-

verbrennung eines Patienten A.O., Station 26, zeigten in dem vorher beschriebenen Medium mit Zusatz 1 Mikrotropfchens der obigen TERRAMYCIN-Lösung eine sehr geringe bis keine Proliferation, aber auch gute Proliferationen, die dann in der 1. Passage mit TERRAMYCIN behandelt wurden und daraufhin in ihrer Zellvermehrung sistierten.

#### Versuchsserie 6:

Mit einer neuen Konzentrationsstufe von 20 mg TETRAMYCIN : 10 ml Reconstituting Fluid (DIFCO) wurde Narbengewebe einer Patientin E.F., Station 26, in 1. Passage dotiert. Nach 5 Tagen Kulturzeit konnte nur eine geringe Zellwucherung eruiert werden. Mit verlängerung der Kulturzeit verliert sich aber der erste Eindruck, die geschädigten Zellen werden abgestoßen und neues Gewebe schiebt sich unter der primären Wachstumszone hervor.

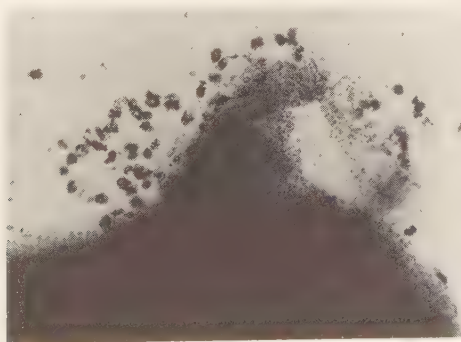


Abb. 53. Hautfragment von Narbengewebe einer Patientin E.F. In der 1. Passage Gabe eines Mikrotropfchens von 20 mg TERRAMYCIN : 10 ml Reconstit-Fluid. Geringe Zellwucherung, Abstoßung geschädigter Zellen.  
Original, 500 x

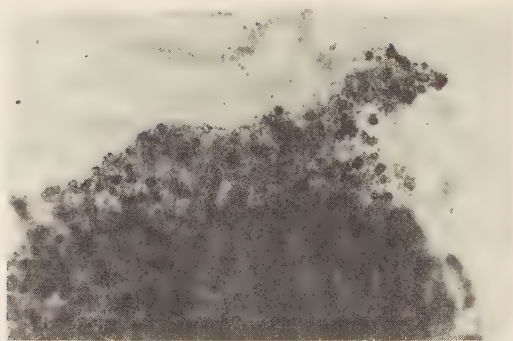


Abb. 53 a. Kontrollkultur ohne Zusatz, langsames Vorschieben des Epithels .  
Original, 500 x

#### Versuchsserie 7:

Narbengewebe von Ulcus cruris der Patientin G.N., Narbengewebe von Ulcus cruris der Patientin E.W., Narbengewebe des Patienten F.L. wurden mit der Konzentrationsstufe von 20 mg TERRAMYCIN : 10 ml Reconst. Fluid konfrontiert. Dabei ergab sich bei allen Kulturen das gleiche Bild einer noch gehemmten Zellvermehrung, mit Unruhe an der Schnittkante und einzelnen Zellspitzen.

(s. Abb. 54, 54a, 54b, S. 119 )

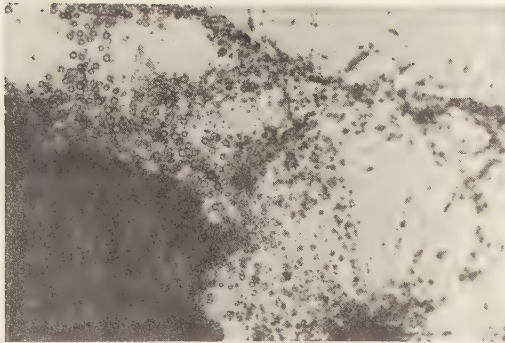


Abb. 54. Explantat aus dem Narbengewebe eines Ulcus cruris der Patientin G.N. wurden mit der Testlösung 20 mg OTC : 10 ml Reconstit.Fluid konfrontiert. Noch gehemmte Proliferation. Original, 2000 x

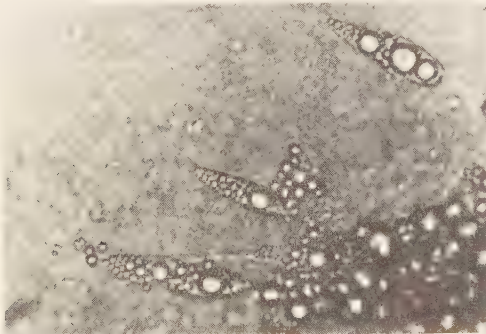


Abb. 54a. Übersichtsbild des vorherigen Bildes. Periphere Zone entfernt sich nach Auflösung der mittleren Zone. Original, 500 x

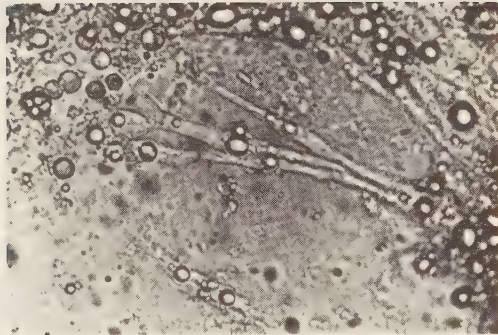


Abb. 54 b. Einzelne Zellstränge überbrücken die aufgelösten Teile der Lysezone.  
Original, 2000 x

#### Versuchsserie 8:

Embryonale Kopfhaut vom 12 Tage alten Hühnerembryo wurde mit einer Lösung von 20 mg TERRAMYCIN : 10 ml Reconstit. Fluid dotiert und zeigte nach 3 Tagen Kultur eine sehr ausgeprägte, starke Lyse, so daß das Explantat aus dem Medium herausgelöst wird und abschwimmt. Keine Proliferation an der Schnittkante.

Kontrollen: Gute bis sehr gute Zellproliferation.

#### Versuchsserie 9:

Haut vom adulten Menschen wurde mit der Testlösung von 20 mg : 5 ml physiolog. Lösung konfrontiert. Auffallend die braune Verfärbung des Zellinhaltes = Metabolit des TERRAMYCINS. Die Zellvermehrung war sehr stark inhibiert. Kontrollen: Gute Progression an der Schnittkante.

Versuchsserie 10:

Humanhaut von folgenden Patienten K.L., I.R., A.G. erhielt in der 1. Passage 1 Mikrotropfen einer Konzentration von 20 mg TERRAMYCIN : 100 ml physiolog. NaCl-Lösung. Nach 24 Stunden konnte noch keine allgemeine Übersicht gewonnen werden, nach 72 Stunden aber zeigte sich die erste Gewebereaktion in ersten Epithelzapfen und geringer Stromaproliferation. Dieses Bild blieb auch über verlängerte Kulturzeit erhalten.

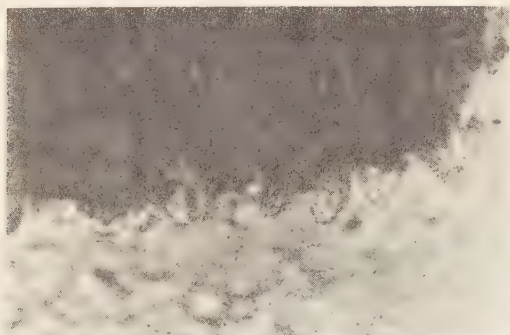


Abb. 55. Humanhaut von einigen Patienten der Hautklinik erhielt in der 1. Passage 1 Mikrotropfen einer Testlösung von 20 mg OTC : 100 ml physiolog. NaCl-Lösung. Erste Epithelzapfen und geringe Stromaproliferation. Original, 200 x



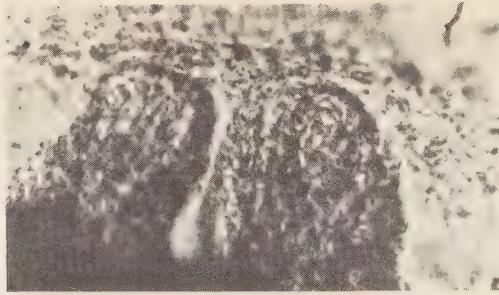


Abb. 55a . Vergrößerung der Epithelzapfen zeigen den Vorstoß in die Peripherie. Original, 2000 x

Versuchsserie 11:

Wurde Haut von den oben genannten Patientinnen mit einer Lösung von 20 mg TERRAMYCIN : 500 ml R-L-Lösung versetzt, so ergab sich bei allen Kulturen eine Anregung der Proliferation des Epithel-Anteils der Haut, wogegen der bindegewebige Anteil in der Vermehrung zurücktrat.



Abb. 56. Humanhaut-Explantat mit vorwiegend vorstoßendem Epithel-Anteil der Haut, nach Dotation 1 Mikrotropfens der Lösung von 20 mg OTC : 500 ml R-L-Lösung. Original, 450 x



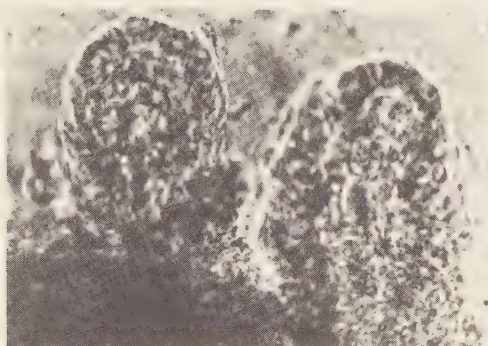


Abb. 56 a. Vergrößerung der Epithelzapfen zeigt den Aufbau in zwei verschiedene Schichten.  
Original, 2000 x

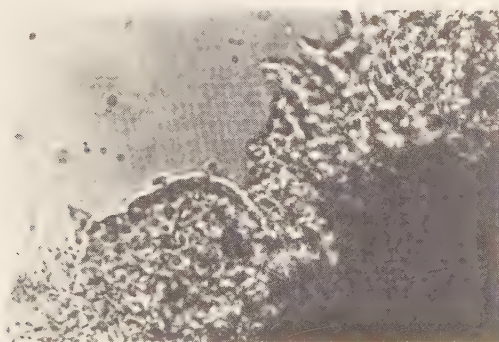


Abb. 56 b. Vergrößerung weist auf eine morphologisch-  
anders figurierte Proliferation hin.  
Epithelmembran.  
Original, 2000 x

Versuchsserie 12:

Epidermis-Explantate vom 9 - 12 Tage alten Hühnerembryo erhielten 1 Mikrotröpfchen einer Lösung von 20 mg TERRAMYCIN : 500 ml R-L-Lösung. Dabei zeigte sich dann nach 4 Tagen ein mäßig-gutes Wachstum zweier unterschiedlich figurierter Zelltypen : eine lange, schmale Fibrozyten-ähnliche Form und eine runde, ovale mit starker Speicherung.

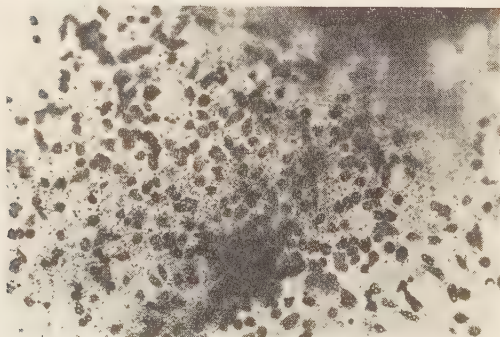


Abb. 57. Epidermis-Explantate (9 - 12 Tg) wurden mit der Testlösung von 20 mg OTC : 500 ml Lösungsmittel konfrontiert. Auffällig ist eine Proliferation von dunklen Zellen in der Wachstumszone.  
Original, 450 x

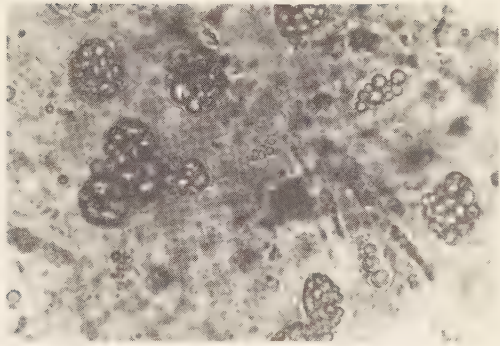


Abb. 57 a. Einzelne dieser Zellen vergrößert.  
Aufquellen durch Speicherung einer phago-  
zytierten Substanz.  
Original, 2000 x

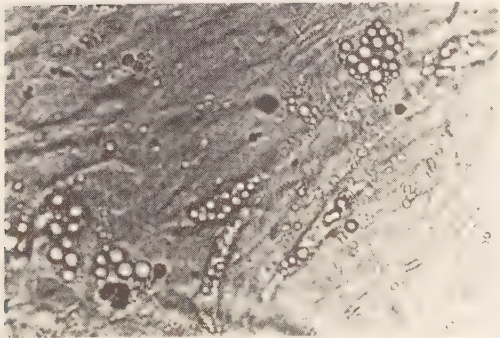


Abb. 57 b. Fibrozytäre Zellen aus diesem Explantat  
speichern stark lichtbrechende Substanz.  
Original, 2000 x

| Testgewebe     | "TERRAMYCIN Pfizer" Konzentrationen |               |                             |
|----------------|-------------------------------------|---------------|-----------------------------|
|                | 1 mg/ml                             | 2 mg/1 ml     | 0,04 mg/1 ml                |
| Haut ( 9 Tg)   |                                     |               |                             |
| Haut (12 Tg)   |                                     |               |                             |
| Haut (12 Tg)   |                                     | starke Inhib. |                             |
| Haut (9-12 Tg) |                                     |               | mäßig-gute<br>Proliferation |

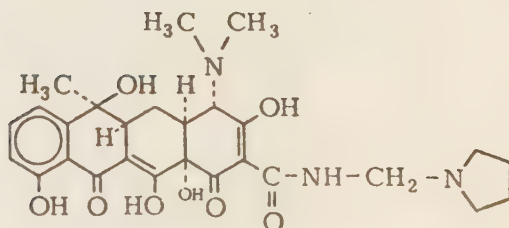
Tabelle 11: Hautreaktion auf "TERRAMYCIN Pfizer"-Gaben

### 3. PYRROLIDINO-METHYL-TETRACYCLIN

"REVERIN" - Hoechst

Charge OP Nr. 1236,1308,1319

Reinsubstanz "Hoechst"



Rolitetetracyclin (Reverin®)

Formel des ROLITETRACYCLINS

Versuchsserie 1:

Kardialmuskel- und Epidermis-Explantate (8 Tg) wurden im Zustand höchster Zytodifferenzierung mit 1 gtt von 0,05 ml einer Lösung von 275 mg des Pyrrolidino-methyl-TETRACYCLINS "REVERIN" in 100 ml physiologischer Na-Cl-Lösung angesetzt. Nach 24 Stunden auffallend starke Lyse des Mediums und Unruhe an der Schnittkante. Die Epidermis-Explantate boten das gleiche Bild, das sich auch nach 5 Tagen Kulturzeit nicht änderte.



Abb. 58. Epidermis-Explantat vom 8 Tage alten Hühner-embryo. Inhibierte Epithelproliferation nach Zugabe von 0,055 mg des TETRACYCLINS "REVERIN".

Original, 200 x

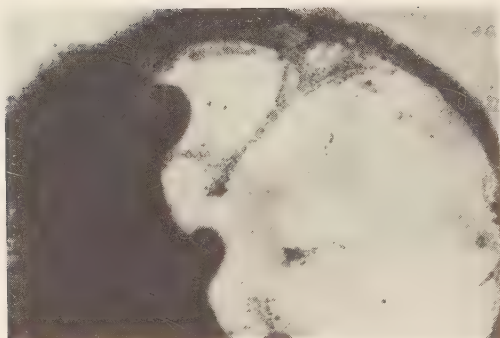


Abb. 58 a. Epidermis-Fragment der gleichen Versuchsreihe, jedoch ohne TETRACYCLIN-Zusatz als Kontrolle. Auffallend die viel breitere Epithelwachstumszone. Durch eine starke Proteolyse wird die Wachstumszone vom Mutterstück getrennt. Vereinzelt Rückwanderung einzelner Epithelzellstränge.  
Original, 200 x

#### Versuchsserie 2:

Gewebe des embryonalen Kardialmuskels, der Leber und der Haut (8 Tg) erhielten als Testdotation 1 Mikrotropfen einer Lösung von 100 mg REVERIN : 100 ml physiologischer Lösung. Bei sämtlichen durchaus im Aufbau unterschiedlichen Geweben zeigte sich eine stark gehemmte Zellproliferation.

#### Versuchsserie 3:

So sehr unterschiedliche Gewebe wie Kardialmuskel, Haut, Os frontale, und die Koronargefäße (12 Tg) erhielten einen Testtropfen einer Lösung von 2 mg REVERIN : 20 ml R-L-Lösung. Hier erscheint ein ganz anderes Erscheinungs-

bild auf Grund der Konzentration:

|                |                                          |
|----------------|------------------------------------------|
| Kardialmuskel: | Gute bis mäßige Zellproliferation        |
| Os frontale :  | Starke Osteoblastenproliferation         |
| Haut :         | Gute bis mäßig-geringe Zellproliferation |
| Koronargefäße: | Sehr starke Fibroblastenproliferation.   |



Abb. 59 . Kardialmuskel-Explantat (12 Tg) + Testtropfen  
einer Lösung von 2 mg REVERIN : 20 ml R-L-Lö-  
sung. Mäßig-gute Zellproliferation, etwas  
aufgelockert.  
Original, 200 x





Abb. 59 a. Sehr dichte Fibroblasten-Emigration  
vom Explantat in Richtung auf die Wachstums-Randzone  
Original, 200 x

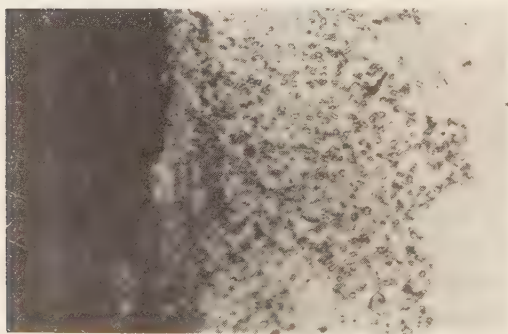


Abb. 60 Haut-Explantat nach der gleichen Dosis  
mit verformten Zellen, entstanden durch  
die toxische Einwirkung  
Original, 200 x

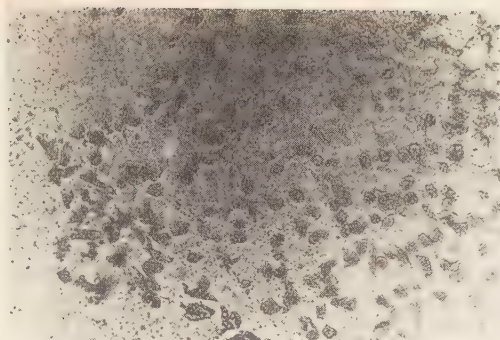


Abb. 50 a. Vergrößerung der Zellen der Wachstums-Peri-  
pherie. Zellen erscheinen gestaucht.  
Original, 500 x

| Testgewebe              | PYRROLIDINO-Methyl-TETRACYCLIN<br>"REVERIN" - Konzentrationen |                |                              |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------|
|                         | 1 gtt = 0,05 mg                                               | 0,02 mg        | 0,002 mg                     |
| Kardial-<br>muskel (8)  | Unruhe                                                        |                |                              |
| Epidermis               | Unruhe                                                        |                |                              |
| Kardial-<br>muskel (8)  |                                                               | starke Hemmung |                              |
| Leber                   |                                                               | starke Hemmung |                              |
| Epidermis               |                                                               | starke Hemmung |                              |
| Kardial-<br>muskel (12) |                                                               |                | gute Prolife-<br>ration      |
| Epidermis               |                                                               |                | gute Prolife-<br>ration      |
| Os frontale             |                                                               |                | starke Pro-<br>liferation    |
| Koronargefäße           |                                                               |                | sehr starke<br>Proliferation |

Tabelle 12 Gewebsreaktionen auf "REVERIN"-Gaben

Versuchsserie 4:

Haut vom Handrücken mit einer Tätowierung einer Patientin B.F., 18 Jahre alt, Station 30, wurde in Epidermis und Cutis getrennt, im vorher für adulte Haut angegebenen Medium kultiviert und erhielt 1 Tropfen einer Konzentration von 2 mg REVERIN : 10 ml physiologischer Kochsalzlösung dotiert. Während die Kontrollen sowohl Epithel- als auch Bindegewebewachstum ausbilden, zeigte sich bei den Epithelien eine starke Inhibierung des Epithels.

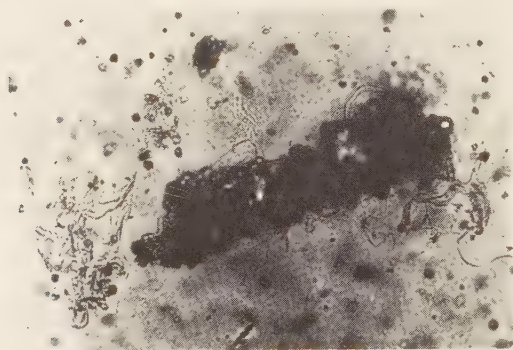


Abb. 61. Hautfragment, gefärbt aus Tätowierung auf dem Unterarm, Exzision der Tätowierung. Geringe Zellproliferation, bedingt durch die Farben, deponiert im Gewebe und den Zusatz 1 Mikrotropfens von 2 mg RV : 10 ml physiologischer NaCl-Lösung

Original, 500 x

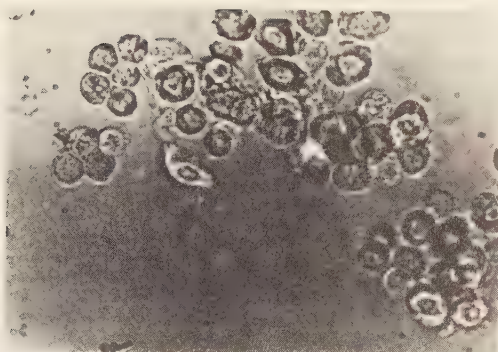


Abb. 61 a. Hautepithelzellen vom Menschen, ausgewachsen aus einem Hautfragment, als Kontrolle  
Original, 2000 x

#### Versuchsserie 5:

Haut (12 Tg) reagierte auf die Testlösung von 2 mg REVERIN : 20 ml Lösungsmittel mit einer guten Zellproliferation, die eine anfängliche Hemmung nicht ausschließen ließ.

(s. Abb. 62 u. 62 a, S. 134 )

#### Versuchsserie 6:

So im Aufbau verschiedene Gewebe vom Kardialmuskel, Koronargefäßen, Os frontale, Leber und Haut (12 Tg) ließen nach 4 Tagen als Reaktion auf einen Tropfen einer Lösung von 2 mg REVERIN : 50 ml physiolog. Lösung unterschiedliche Reaktionen erkennen.

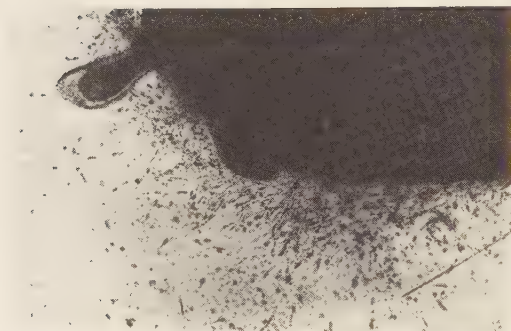


Abb. 62. Embryonale Hühnerhaut (12 Tg) nach Einwirkung einer Testlösung 2 mg : 20 ml.  
Mäßige Zellproliferation bedingt durch die Toxizität des RV.  
Original, 200 x



Abb. 62 a. Kontrolle, ohne Zusatz, läßt eine ungehemmte Vermehrung erkennen.  
Original, 120 x

|                |                                                     |
|----------------|-----------------------------------------------------|
| Kardialmuskel: | Geringe, stark inhibierte Zellproliferation         |
| Koronargefäße: | Geringe, aber auch gute, inhibierte Proliferation   |
| Os frontale :  | Geringe inhibierte Zellmigration                    |
| Leber :        | Inhibierte Zellvermehrung, Lyse an der Schnittkante |
| Haut :         | Geringe, augenscheinlich gehemmte Zellvermehrung    |

Dieser Eindruck änderte sich auch nach Verlängerung der Kulturzeit nicht.

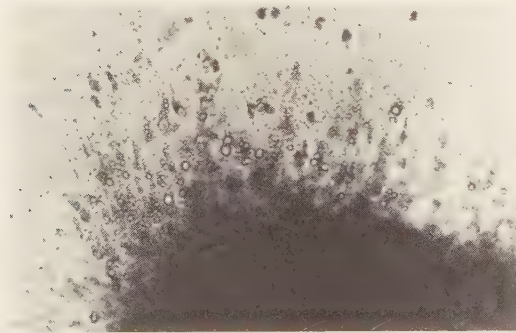


Abb. 63. Kardialmuskel-Explantat (12 Tg) kann durch die toxische Einwirkung von 2 mg RV : 50 ml Lösungsmittel nur eine begrenzte Wucherung von Zellen ermöglichen.  
Original, 500 x

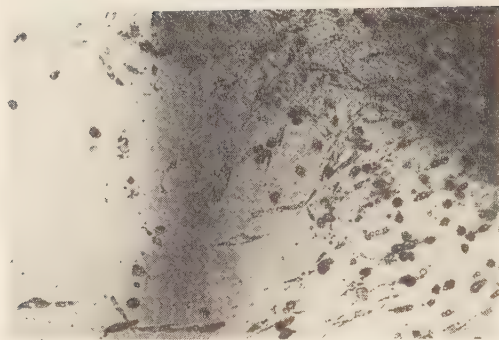


Abb. 63 a. Haut-Explantat-Kontrolle, ohne Zusatz, zeigt ein normales Bild ungehemmter Zellproliferation.  
Original, 500 x

#### Versuchsserie 7:

Die gleichen Gewebe wurden mit einer Lösung von 2 mg : 100 ml versetzt. Trotz der größeren Verdünnung reagierten sämtliche Gewebe mit einer starken Hemmung der Zellmigration in die Wachstumszonen, es bestand gar keine Wachstumszone. (s. Abb. 64 und 64 a, S. 137 )

#### Versuchsserie 8:

Embryonaler Kardialmuskel (15 Tg) reagierte auf 2 mg : 100 ml mit sehr starker Inhibition und auf 2 mg : 500 ml zwar mit Wachstum, aber ebenfalls noch retardiert.





Abb. 64. Koronargefäß-Kultur (12 Tg) nach Einwirkung eines Mikrotropfens einer Testlösung von 2 mg RV: 100 ml Lösungsmittel. Sehr starke Inhibition der Zellvitalität.  
Original, 200 x



Abb. 64 a. Emigrationszone des Koronargefäß-Explantats. Sehr starke Speicherung von Testlösung in den Zellen, dadurch nur geringe Zellvitalität.  
Original, 500 x

Versuchsserie 9:

Auch eine Konzentration von 2 mg REVERIN : 500 ml physiologische NaCl-Lösung erzielt bei Koronargefäß-, Os frontale-, Kardialmuskel-, Leber- und Haut-Explantaten (13 Tg) nach 6 Tagen Kulturzeit keine Zellproliferation.

Versuchsserie 10:

Dieselbe Konzentration erzielt an der Haut und der Leber eines humanen Foeten, mens 1 - 2, nach Dotation in der 1. Passage nach einer Kulturzeit von 5 Tagen folgendes Ergebnis:

Haut: Mäßige Zellproliferation

Herz: Geringes Wachstum

Leber: Geringes bis mäßiges Leber-Epithelwachstum

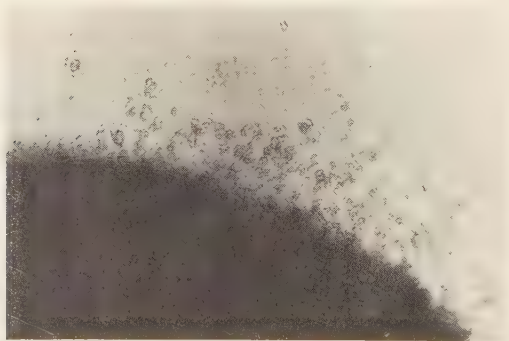


Abb. 65. Hautfragment von einem Foeten, mens 1 - 2, nach Dotation 1 gtt einer Lösung von mg RV : 500 ml Lösungsmittel zeigt eine mäßig-inhibierte Zellproliferation.  
Original, 500 x

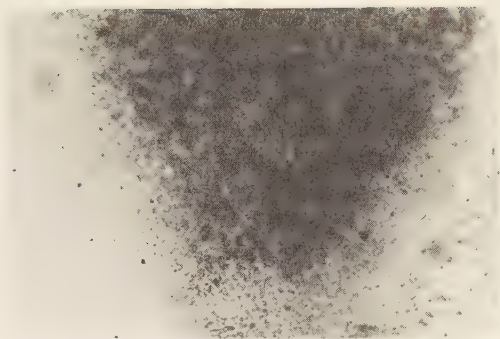


Abb. 65 a. Kontrollkultur mit guter Zellmigration  
Original, 500 x

Versuchsserie 11:

Wurden Gewebe vom Kardialmuskel, den Koronargefäßen, der Leber, dem Os frontale, den Nieren und der Haut (12 Tg) mit 1 Mikrotropfen einer Lösung von 2 mg REVERIN : 500 ml R-L-Lösung versetzt, so ergab sich nach 4 Tagen Kulturzeit folgendes Zellbild:

|                |                                                           |
|----------------|-----------------------------------------------------------|
| Kardialmuskel: | Gute, gering-inhibierte Zellproliferation                 |
| Koronargefäße: | Gute, geringgradig inhibierte Zellvermehrung              |
| Leber          | : Mäßige, noch inhibierte Zellproliferation               |
| Os frontale    | : Sehr gute, fast stimulierte, Osteoblasten-Proliferation |
| Niere          | : Gute Epithelproliferation                               |
| Haut           | : Mäßig-gute Zellvermehrung                               |

Nach weiteren 4 Tagen Kulturzeit trat in diesem Status kein Wechsel ein.

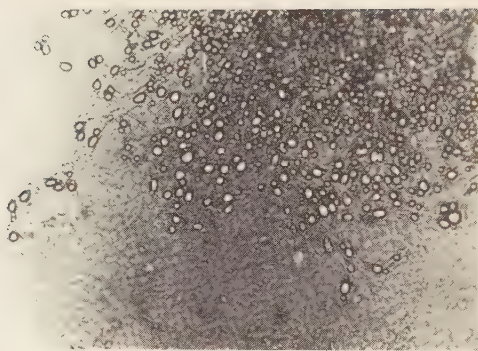


Abb. 66. Koronargefäß-Kultur-Randzone (12 Tg) nach Zugabe von 1 gtt einer Lösung von 2 mg RV : 500 ml R-L-Lösung. Gute, geringgradig inhibierte Zellvermehrung mit Speicherung einer stark lichtbrechenden Substanz in den Zellen.  
Original, 500 x

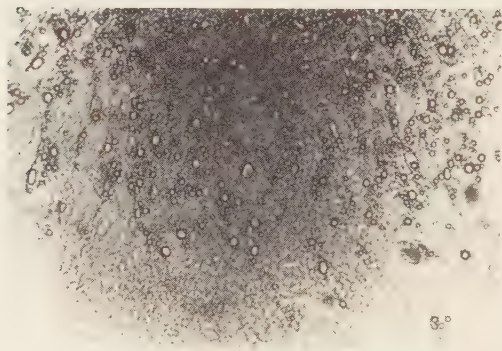


Abb. 66 a. Os frontale unter gleicher Dosierung sehr gute Osteoblasten-Proliferation, geringgradige Speicherung in den Zellen.  
Original, 500 x

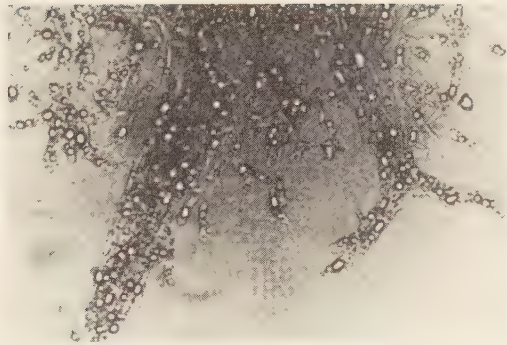


Abb. 66 b. Vergrößerung des Os frontale-Bildes wird gekennzeichnet durch einzelne "Riesenzellen".  
Original, 1200 x  
(s. Tab. 13, S.142 )

#### Versuchsserie 12:

Haut aus dem Oberschenkel eines Operierten wurde getrennt in Epidermis und Dermis kultiviert. Erst nach Eintritt einer gewissen Zellproliferation wurde nach der Neufütterung in der 2. Passage 100 mg REVERIN : 400 ml Medium Hornheide dotiert. 48 Stunden nach Ansatz zeigte sich bei der Epidermis eine mäßig-geringe Proliferation mit ersten Epithelzapfen, bei der Dermis eine stärkere Zellvermehrung und bei den Kontrollen ebenfalls eine gute Zellvermehrung.

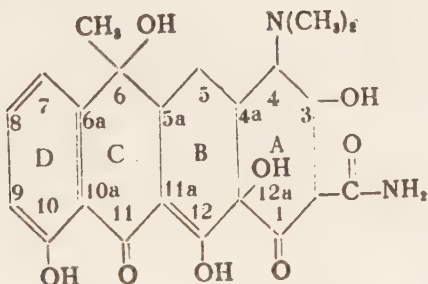
| Testgewebe          | "REVERIN"-Konzentration pro 1 gtt |                   |                       |                         |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|
|                     | 2,ug                              | 0,4,ug            | 0,8,ug                | 0,08,ug                 |
| Haut (12)           | Gute Proliferation                |                   |                       |                         |
| Kardial-muskel(12)  |                                   |                   | geringe Proliferation |                         |
| Koronar-gefäße      |                                   |                   | gering-gut            |                         |
| Os frontale         |                                   |                   | gering-inhibiert      |                         |
| Leber               |                                   |                   | gering-inhibiert      |                         |
| Haut                |                                   |                   | gering-inhibiert      |                         |
| Kardial-muskel(12)  |                                   | starke Inhibition |                       |                         |
| Koronargefäße       |                                   | starke Inhibition |                       |                         |
| Os frontale         |                                   | starke Inhibition |                       |                         |
| Leber               |                                   | starke Inhibition |                       |                         |
| Haut                |                                   | starke Inhibition |                       |                         |
| Kardial-muskel (15) |                                   | starke Inhibition |                       |                         |
| Kardial-muskel (15) |                                   |                   |                       | verzög.Wt.              |
| Kardial-muskel (13) |                                   |                   |                       | Inhibition              |
| Koronargefäße       |                                   |                   |                       | Inhibition              |
| Os frontale         |                                   |                   |                       | Inhibition              |
| Leber               |                                   |                   |                       | Inhibition              |
| Haut                |                                   |                   |                       | Keine Zellproliferation |
| Kardial-muskel (12) |                                   |                   |                       | gut-gering inhibiert    |
| Koronargefäße       |                                   |                   |                       | desgleichen             |
| Os frontale         |                                   |                   |                       | stimul.Prol.            |
| Leber               |                                   |                   |                       | mäßig-inhib.            |
| Haut                |                                   |                   |                       | mäßig-gut               |
| Nieren              |                                   |                   |                       | gute Prolif.            |

Tabelle 13 Wachstumsreaktion nach "REVERIN"-Gabe

4. TETRACYCLIN Kristallin

"ACHROMYCIN" - Lederle  
Charge 5350-78

HCl



Formel ACHROMYCIN

Versuchsserie 1:

Koronargefäß- und Darmfragmente (9 Tg) erhielten einen Zusatz von 0,05 mg des TETRACYCLINS "ACHROMYCIN". Nach 24 Stunden zeigten sowohl apotheliale als auch epitheliale Gewebsfragmente eine starke Inhibition der Zellvitalität, die auch nach 72 Stunden Kulturzeit erhalten blieb.

Versuchsserie 2:

Haut (12 Tg) wird angesetzt und in der 1. Passage mit 1 Mikrotropfen einer Lösung von 500 mg ACHROMYCIN : 50 ml R-L-Lösung : 10 mg : 1 ml konfrontiert. Nach 5 Tagen zeigt sich eine geringe Rundzellproliferation. Auffällig ist das Ausfallen einer amorphen Substanz, entweder das TETRACYCLIN oder ein Metabolit.

Versuchsserie 3:

Bei einer Konfrontation von Haut (12 Tg) mit ACHROMYCIN in der 1. Passage ist ebenfalls trotz größerer Verdünnung 5 mg : 1 ml eine starke Hemmung der Zellmigration festzu-



stellen, nur einzelne Rundzellen an den Schnittkanten. Nach 5 Tagen fällt eine TETRACYCLIN-Medium-Komponente aus oder ein Metabolit. Sowohl an der Schnittkante als auch an den Federanlagen nur einzelne Rundzellen.

#### Versuchsserie 4:

Bei einer noch größeren Verdünnung der Testsubstanz 2,5 mg/10 ml erscheint an den Hautexplantaten (12 Tg) eine auffallend starke, stimulierte Zellproliferation, begleitet von starker Proteolyse. Die Kontrollen zeigen ebenfalls fast keine Unterschiede zu den Testkulturen, denn sie weisen ebenfalls eine starke Proliferation ihrer Epithelien auf.



Abb. 67. Hautexplantat (12 Tg) nach Zusatz eines Mikrotropfens einer Lösung von 2,5 mg ACHROMYCIN : 1 ml R-L-Lösung weist eine auffallend intensive Zellproliferation auf, begleitet von einer ausgeprägten Proteolyse, sichtbar an den Lysefoci. Original, 500 x

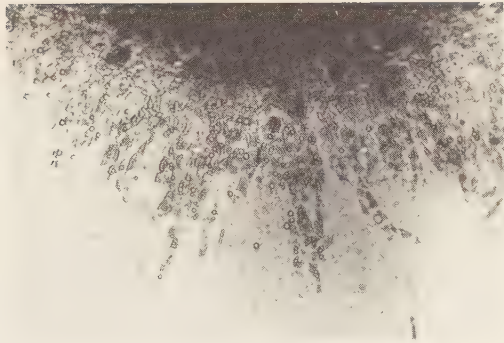


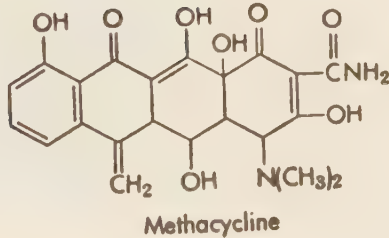
Abb. 67 a. Kontrolle, ohne Zusatz, mit starker Zell-  
emigration vom Zellfragment zur Peripherie.  
Original, 500 x

| Testgewebe             | Reaktionen auf "ACHROMYCIN"-Dotation |                            |                                  |                               |
|------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
|                        | 0,05 mg                              | 0,2 mg                     | 0,1 mg                           | 0,005 mg                      |
| Koronar-<br>gefäße (9) | Inhibition                           |                            |                                  |                               |
| Darm                   | Inhibition                           |                            |                                  |                               |
| Haut (12)              |                                      | geringe Pro-<br>liferation |                                  |                               |
| Haut (12)              |                                      |                            | inhibierte<br>Prolifera-<br>tion |                               |
| Haut (12)              |                                      |                            |                                  | stimul.<br>Prolife-<br>ration |

Tabelle 14 Wachstumstendenz nach ACHROMYCIN-Dotation

5. METHACYCLINUM

"RONDONYCIN" - Mack,  
Illertissen  
Charge 8497



METHACYCLIN-Formel

Versuchsserie 1:

Mit folgenden Konzentrationen

|    | Konz/ml                             | 1 gtt     |
|----|-------------------------------------|-----------|
| a) | 1 mg/1 ml                           | 0,02 mg   |
| b) | 0,5 mg/1 ml                         | 0,01 mg   |
| c) | 0,25 mg/1 ml                        | 0,005 mg  |
| d) | 0,125 mg/1 ml                       | 0,0025 mg |
| e) | 0,06 mg/1 ml Ringer-<br>Laktat Lös. | 0,0012 mg |

wurde die Haut eines Homo sapiens var. europaeus, mens  
4-5 konfrontiert. Nach 8 Tagen Kulturzeit ergab sich  
für die einzelnen Konzentrationen folgendes morphologi-  
sches Bild:

- a) Starke Inhibition der Zellvitalität
- b) Unruhe an der Schnittkante, aber deutliche  
Inhibition
- c) Viele aussprossende Zellelemente, stark und  
prall angefüllt mit einer stark lichtbrechenden  
Substanz

... d),e)

- d) Gute Zellproliferation, kaum Lyse
  - e) Gute bis sehr starke, stimulierte Aussprossung von Zellelementen, keine Inhibition.
- Auffallende Stimulation.

Die Kontrollen zeigten das Bild einer guten Sprossung, sogar bei den Follikelzellen.



Abb. 68. Haut von einem Foeten, mens 4.5, wurde explantiert und für die Kultur zurechtgeschnitten. Zugleich mit dem Ansatz erhielt jede Kultur 1 gtt einer Lösg. von 0,5 mg RONDONYCIN : 1 ml R-L-Lösung. Deutliche Inhibition mit Zerfall der Gewebeverbände. Original, 500 x

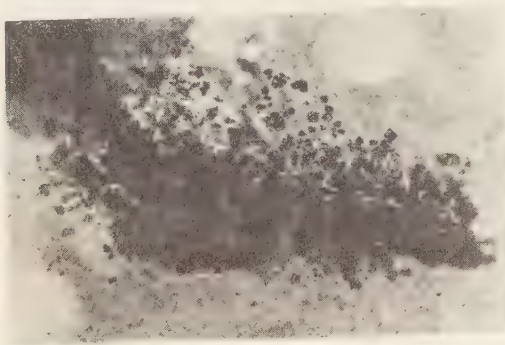


Abb. 68a. Zerfall der Gewebe, Nekrose der Zellen  
Original, 1500 x

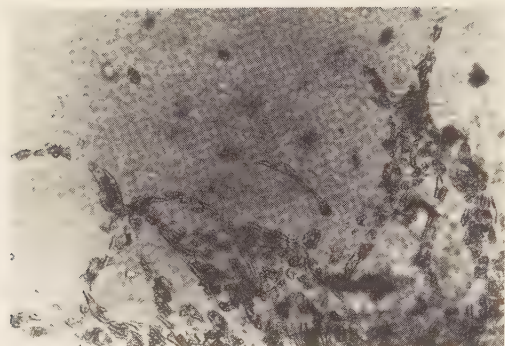


Abb. 69. Haut-Kultur menschlicher Haut zeigt die gute Proliferation. Original, 500 x

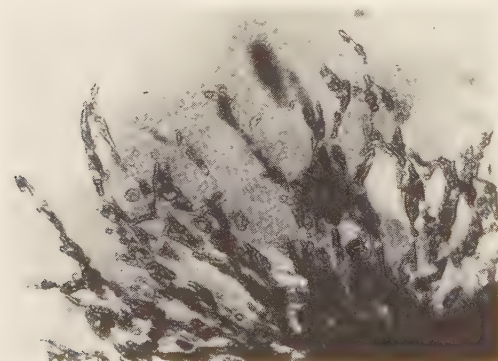


Abb. 69 a. Hautkultur in Sprossung  
Original, 500 x

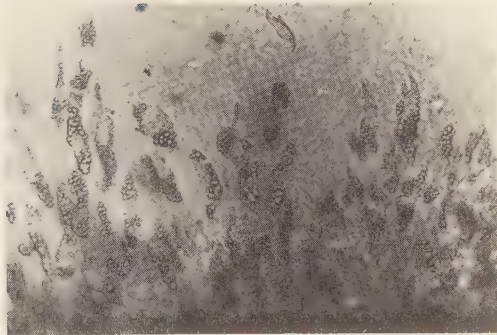


Abb. 7o. Humanhaut in Kultur, nach Zugabe von 1 gtt einer Lösung 0,025 mg RONDOMYCIN : 1 ml . Starke Speicherung einer zellfremden Substanz. Mäßige Hemmung. Original, 1200 x

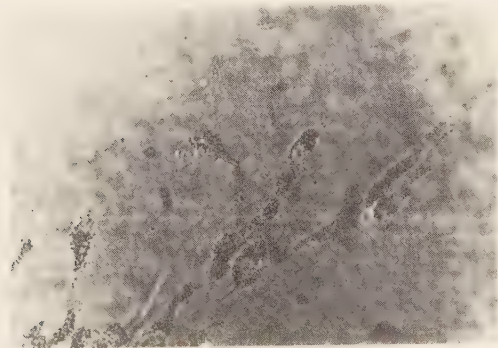


Abb. 7o a. Humanhaut nach Zugabe 1 gtt einer Lösung von 0,125 mg : 1 ml. Ebenfalls starke Speicherung der Testlösung. Original, 1200 x



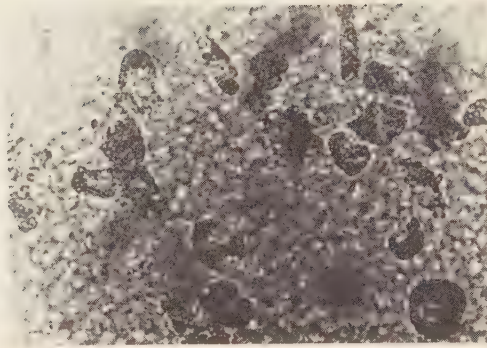


Abb. 71. Humanhaut, mens 4-5, nach Zugabe 1 gtt einer Lösung von 0,06 mg : 1 ml R-L-Lösung zeigt sehr große Rundzellen, die durch die toxische Einwirkung geplatzt sind und ihren Inhalt in das Medium herausdrücken. Original, 1200 x

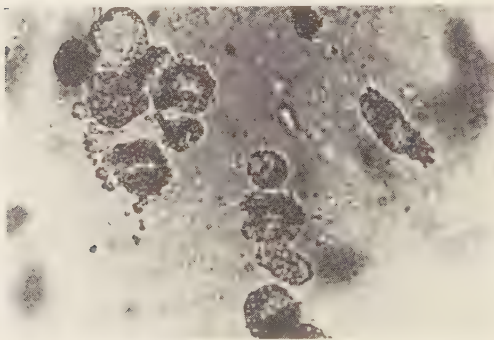


Abb. 71a. Kontrolle ohne Zusatz zeigt ebenfalls große Rundzellen, die aber nicht durch Turgorveränderungen geplatzt sind.  
Original, 1200 x



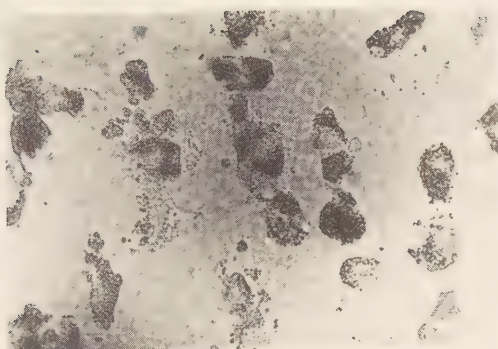


Abb. 72. Humanhaut nach Einwirkung 1 gtt einer Lösung von 0,06 mg : 1 ml Lösungsmittel. Zerfall der Zellen durch toxische Einwirkung. Original, 1200 x

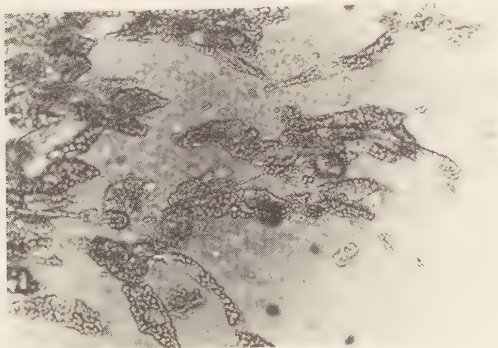


Abb. 72a. Kontrolle, ohne Zusatz, zeigt das normale Bild von Hautfibroblasten, die zwar auch Flüssigkeit aus dem Medium aufgenommen haben, aber sich normal vermehren. Original, 1200 x

### Versuchsserie 2:

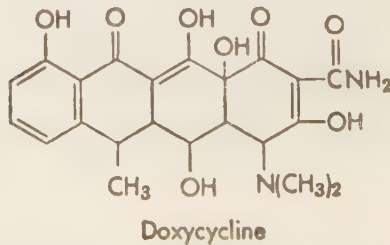
Wurde Haut (12 Tg) von embryonalen Hühnern den gleichen Bedingungen wie zuvor unterworfen, so zeigten sich bei den hohen Konzentrationen die gleichen Inhibitionseffekte wie bei der foetalen Humanhaut. Os frontale mit einer Konzentration von 1 mg/1 ml, das bedeutet 0,02 mg je Kultur, angesetzt, läßt auch eine vollständige Inhibition erkennen.

| Testgewebe                 | je Kultur 1 gtt "RONDONMYCIN"-Lösung |         |          |           |            |
|----------------------------|--------------------------------------|---------|----------|-----------|------------|
|                            | 0,02 mg                              | 0,01 mg | 0,005 mg | 0,0025 mg | 0,00125 mg |
| Haut<br>(Foet mens<br>4-5) | ---                                  | --      | ---+     | +++       | ++++       |
| Haut<br>(Huhn) (12)        | ---                                  | ---     | +        | ++        | +++        |
| Os frontale                | Inhibi-<br>tion                      | --      | +        | ++        | +++        |

Tabelle 15 Proliferationstendenz nach "RONDONMYCIN" -  
Dotation

6. DOXYCYCLIN

"VIBRAMYCIN" - Pfizer Charge 9440



Formel für DOXYCYCLIN (VIBRAMYCIN (R))

### Versuchsserie 1:

Die Haut von zwei Patienten, W.P., 33 Jahre alt, und P.D., 84 Jahre alt, wurde angesetzt, in der 1. Passage umgesetzt und zu diesem Medium 1 Mikrotropfen der Lösung von 20 mg VIBRAMYCIN : 20 ml R-L-Lösung dazugegeben. Beide Versuchsansätze reagierten auf die verhältnismäßig hohe Dosierung von 1 mg : 1 ml mit einer geringen Proliferation an der Schnittkante.

### Versuchsserie 2:

Mit der gleichen Konzentration, 1mg VIBRAMYCIN : 1 ml Lösungsmittel = 0,02 mg pro Kultur, wurde explantierte Haut vom 9 Tage alten Hühnerembryo mit Zusatz der obigen Lösung angesetzt. Nach 5 Tagen Kulturzeit: Inhibition sämtlicher zellulärer Aktivität.

### Versuchsserie 3:

Wurde Haut (9 Tg) einer Konzentration von 2 mg : 1 ml gegenübergestellt, so zeigte sich bei der höheren Konzentration eine Ausbildung von morphologisch verbildeten Zellen - Rundzellen. (s. Abb. 73 und 73 a, S.154)

### Versuchsserie 4:

Der gleichen Konzentration wurden Os frontale- und Koronargefäß-Explantate (12 Tg) ausgesetzt. Hier ergab sich ein ähnliches Bild wie zuvor. Bei den Os frontale-Kulturen eine ganz geringe, stark inhibierte Zellvermehrung, aber einzelne abtropfende Zellen an den Stirnbein-Kanten. Die Koronargefäß-Kulturen waren total inhibiert, wegen die Kontrollen das typische Bild einer ungehemmten Zellmigration zeigten.

### Versuchsserie 5:

Embryonale Hühnerhaut (12 Tg) wurde mit den Lösungen 2 mg : 1 ml und 4 mg : 1 ml konfrontiert. Wie zu erwarten,

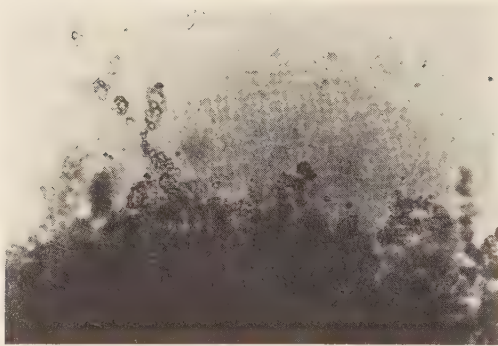


Abb. 73. Wurde Haut (9 Tg) einer Konzentration von 2 mg VM : 1 ml gegenübergestellt, so zeigt sich bei der hohen Konzentration eine Umwandlung der Zellmorphologie= verbildete Zellen, aber trotz Hemmung eine mäßige Proliferation. Original, 1200 x

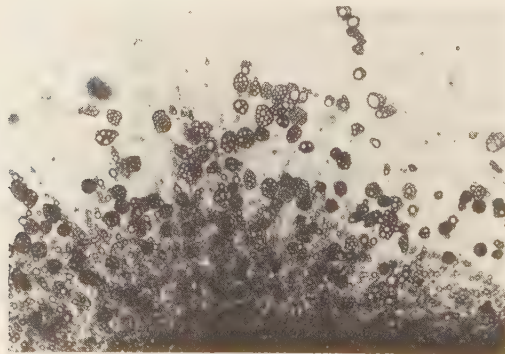


Abb. 73 a. Embryonale Haut (12 Tg) in Kultur, nach 3 Tagen Kultur, weist auf ein ungestörtes Wachstum hin. Original, 1200 x

war die Zellvitalität vollständig gehemmt, aber ein anderes Bild lenkte die Aufmerksamkeit des Beobachters auf sich: Ein starker Ausfall von braungefärbten Medium-Antibiotikum- oder eines Tetracyclin-Metaboliten!

#### Versuchsserie 6:

Haut-Explantate (12 Tg) wurden mit einer Lösung von 20 mg VIBRAMYCIN : 500 ml R-L-Lösung verdünnt, von dieser Lösung den Kulturen beim Ansatz dazugesetzt. Hier ergab sich ein viel gefächertes Bild, das von der mäßig-guten Zellvitalität bis zu einer starken, fast stimulierten Zellproliferation reichte.

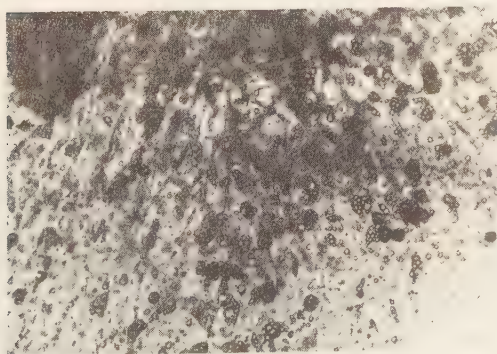


Abb. 74. Embryonalhaut (12 Tg) wurde der Einwirkung 1 Mikrotropfens einer Lösung 20 mg VIBRAMYCIN : 500 ml R-L-Lösung ausgesetzt. Mäßig-gute Zellvitalität unterschiedlich konfigurierter Zellen.  
Original, 500 x

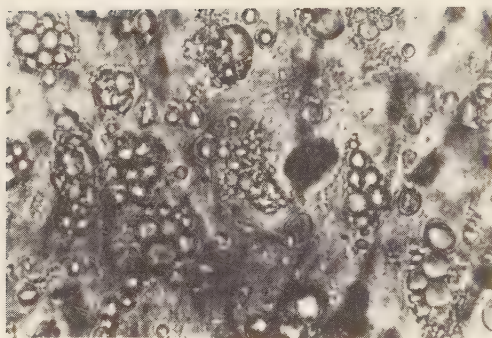


Abb. 74 a. Vergrößerung zeigt starke Speicherung  
der Testlösung in den Zellen.  
Original, 2000 x

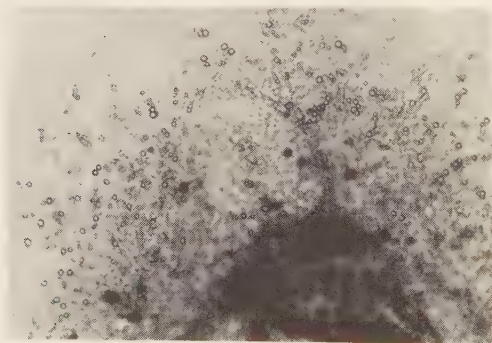


Abb. 74 b. Kontrollkultur. Wachstumszone einer un-  
behandelten Kultur.  
Original, 200 x

| Versuchs-<br>serie | Verdünnung      | mg pro Kultur       |
|--------------------|-----------------|---------------------|
| 1                  | 1 mg/1 ml       | 0,02 mg             |
| 2                  | 1 mg/1 ml       |                     |
| 3                  | 2 mg/1 ml       | 0,04 mg             |
| 4                  | 2 mg/1 ml       |                     |
| 5                  | 2 und 4 mg/1 ml | 0,04 - 0,08 mg/1 ml |
| 6                  | 0,04 mg/1 ml    | 0,0008 mg = 0,8 µg  |

| Testgewebe | je Kultur 1 gtt "VIBRAMYCIN"-Lösung |         |         |          |
|------------|-------------------------------------|---------|---------|----------|
|            | 0,02 mg                             | 0,04 mg | 0,08 mg | 0,008 mg |

|                     |            |            |            |                         |
|---------------------|------------|------------|------------|-------------------------|
| Haut (9)            | Inhibition |            |            |                         |
| Haut (9)            |            | Inhibition |            |                         |
| Os frontale<br>(12) |            | Inhibition |            |                         |
| Koronar-<br>gefäße  |            | Inhibition |            |                         |
| Haut (12)           |            | Inhibition | Inhibition |                         |
| Haut (12)           |            |            |            | mäßig gut<br>stimuliert |

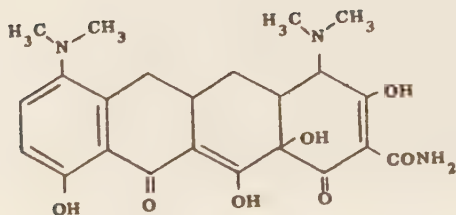
Tabelle 16 Wachstumstendenz nach "VIBRAMYCIN"-Gabe



## 7. MINOCYCLINUM

"KLINOMYCIN"-Lederle

Versuchs-Substanz



**Minocycline**

Formel des MINOCYCLIN

Die Wirkung des MINOCYCLINS auf embryonale tierische und menschliche Zellen in "Kultur".

### Material und Methodik

Die explantierten Gewebe vom embryonalen Huhn (*Gallus domesticus*) und vom menschlichen Foeten wurden in unterschiedlichen Nährmedien mittels verschiedener Kulturverfahren bei pH 7,2 bis 7,5 und 37,5 Grad Celsius kultiviert.

Es wurde die Plasma-clot-Technik mit Hühnerplasma (HP), Hühner-Embryonal-Extrakt (EE) bzw. die Schalen- oder "roller tube-method" und auch die Kultivations-technik mit "Leight n-tubes" angewendet.

Nach Festlegung der Explantate in HP + EE wurde das Kulturmedium Hornheide (KORFSMEIER, 1967 a) : 7,0 ml TCM 199 (DIFCO)



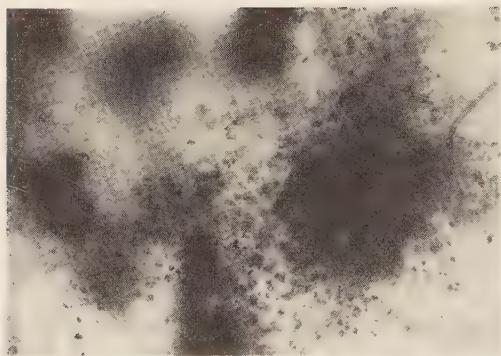


Abb. 75 a. Vergrößerung zeigt, daß die Proliferation  
von den Follikeln ausgeht.  
Original, 500 x

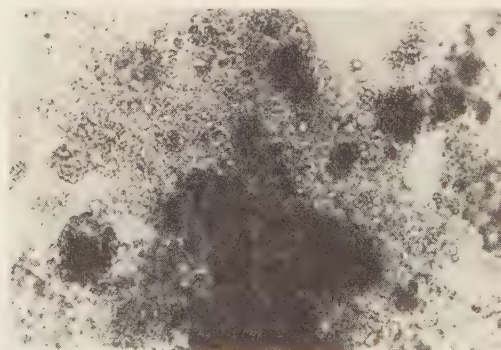


Abb. 75 b. Proliferation aus einem Federfollikel.  
Original, 1200 x

MINOCYCLIN-Test : 2 mg Testsubstanz : 10,50 und 100 ml physiolog. NaCl-Lösung; 50 Mikrotröpfchen = 1 ml, davon je Kultur 1 Mikrotröpfchen.

Nach 6 Tagen Kulturzeit traten an den kultivierten Haut-Explantaten folgende cytologischen Veränderungen ein:

2 mg MINOCYCLIN : 10 ml physiolog. NaCl-Lösung:

Hemmung der Zellproliferation, Emigration von pigmentierten Zellen aus den Haaranlagen.



Abb. 76. Haut, mens 5, MINOCYCLIN 2 mg : 10 ml Lösungsmittel. Hemmung der Zellproliferation. Nur Emigration von pigmentierten Zellen aus den Haarfollikeln.  
Original, 200 x

2 mg : 50 ml obiges Lösungsmittel: Mäßige bis gute Zellproliferation, vorwiegend von Pigmentgranula-haltigen Zellen der Haarbälge. Auffallend starke Lyse des Mediums.

2 mg : 100 ml Lösungsmittel: Keine eigentliche Inhibition, aber noch Stase der Zellvermehrung, keine ausgeprägte Pigmentzellemigration.

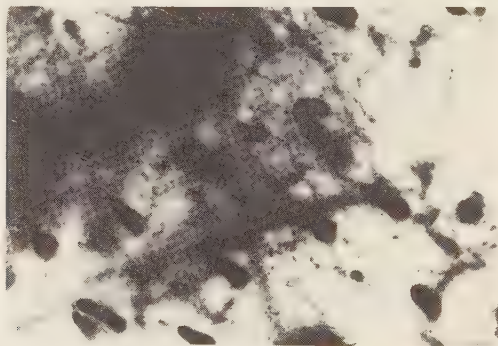


Abb. 76 a. Foetalhaut + MINOCYCLIN 2 mg : 100 ml weist noch auf eine Inhibition hin. Original, 200 x

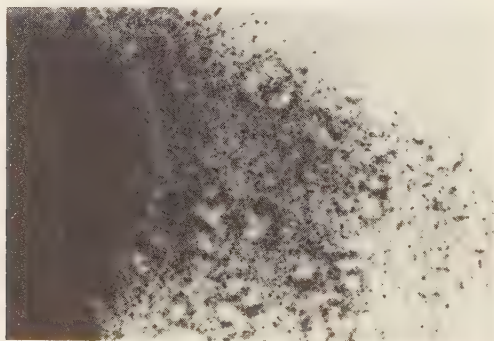


Abb. 76 b. Kontrollkultur der Foetalhaut mit breiter Wachstumszone. Original, 200 x

### Versuchsreihe 2:

Kardialmuskel- und Leber-Explantate von 9 Tage alten Hühnerembryonen wurden ebenfalls nach der Plasma-Extrakt-Methode angesetzt und mit den gleichen Konzentrationsstufen versetzt.

Nach 4 Tagen Kulturzeit gab es folgendes Bild:

#### Kardialmuskel:

- 2 mg / 10 ml: Vollständige Inhibition der Zellproliferation
- 2 mg / 50 ml: Inhibition mit einer retardierten Mitose (Mitosis retarda) mit stark verlängerter Phasenzeit bis zu 21 1/2 Stunden von Ruhekern zu Ruhekern
- 2 mg / 100 ml: Gute bis starke, augenscheinlich stimulierte, Zellproliferation

#### Leber:

- 2 mg / 10 ml: Zellbild reicht von der vollständigen Inhibition bis zur noch deutlich inhibierten aber schon wieder etwas aussprossenden Epithelproliferation
- 2 mg / 50 ml: Inhibition und Zytose
- 2 mg / 100 ml: Mäßig, gehemmte Zellproliferation

(s. Abb. 77 und 77 a , S. )

### Versuchsreihe 3:

Haut von 9 Tage alten Hühnerembryonen wurde nach bewährter Art angesetzt. Gleichzeitig erhielt jede Kultur 1 Mikrotropfen der obigen Konzentrationen dotiert.

Nach 4 Tagen Kulturzeit ergab sich folgendes Bild:

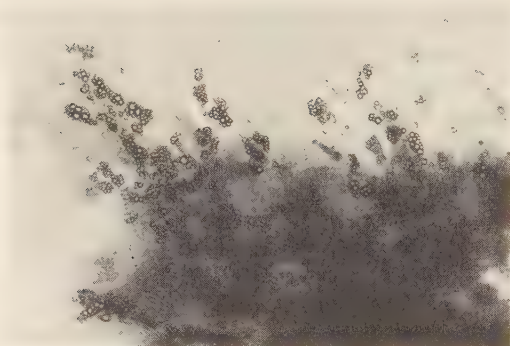


Abb. 77. Leber-Explantat nach Dotierung 1 gtt einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 10 ml Verdünnungsmittel zeigten zwei Erscheinungsformen: Epithelförmiges Auswachsen.  
Original, 500 x

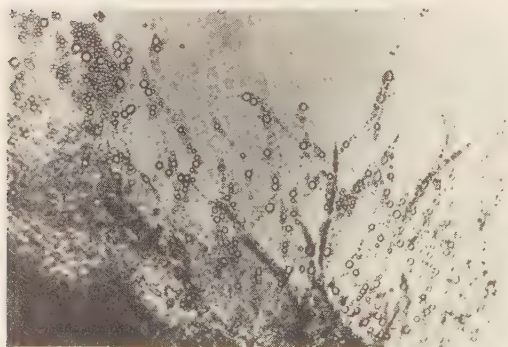


Abb. 77 a. Fibrozytäres Auswachsen der Zellen.  
Original, 500 x



|            |                                                               |
|------------|---------------------------------------------------------------|
| 2 mg / 10  | ml: Mäßige, vorwiegend rundzellartige, gehemmte Proliferation |
| 2 mg / 50  | ml: Starke, ungehemmte Proliferation                          |
| 2 mg / 100 | ml: Sehr starke, fast stimulierte Zellproliferation           |

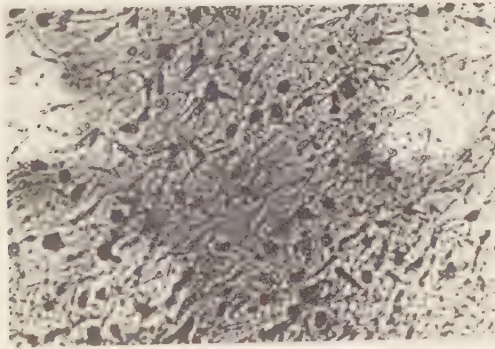


Abb. 78 . Haut-Fragment (9 Tg) wurde nach bewährter Art angesetzt. Dazu 1 Mikrotropfen einer Lösung von 2 mg : 50 ml. Starke ungehemmte Proliferation. Original, 500 x

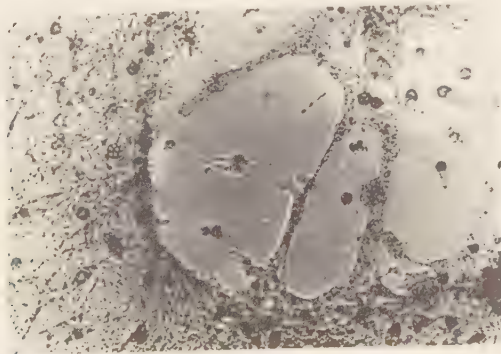


Abb. 78 a. Hautexplantat mit Zusatz 1 gtt der Lösung 2 mg : 100 ml. Gute Proliferation mit Epithelien, aber durch starke Lyse weichen die einzelnen Areale der Wachstumszone auseinander. Original, 500 x



Abb. 78 b. Kontrollkultur zeigt ein zweidimensionales Epithel der Haut. Original, 500 x

#### Versuchsreihe 4:

Haut von 12 Tage alten Hühnerembryonen erhielt mit dem Ansatz je ein Mikrotröpfchen der obigen Konzentrationen. Nach 4 Tagen Kulturzeit ergab sich folgendes Zellbild:

- |               |                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| 2 mg/ 10 ml:  | Vollständige Hemmung der Zellproliferation             |
| 2 mg/ 50 ml:  | Mäßig gute Zellproliferation, Inhibition noch deutlich |
| 2 mg/ 100 ml: | Mäßige, gering inhibierte Zellproliferation            |

(s. Abb. 79, 79a, 79b, S.

#### Versuchsreihe 5:

Ansatz von Magenexplantaten vom 12 Tage alten Hühnerembryo zum Zwecke der Feststellung der Reaktion auf das MINOCYCLIN, weil Patienten der Klinik über Magenbeschwerden nach MINOCYCLIN-Dotierung geklagt hatten.

MINOCYCLIN-Test mit 2 mg : 10 ml, 50 ml und 100 ml des obigen Lösungsmittels. Nach 4 Tagen Kulturzeit ergaben



Abb. 79 . Epidermis (12 Tage) erhielt mit dem Ansatz je 1 gtt der Konzentration 2 mg : 50 ml Lösungsmittel. Nach 72 Stunden Kultur ergab sich das Bild einer mäßig-guten Zellproliferation, der das Bild einer Hemmung noch anzusehen war.

Original, 120 x

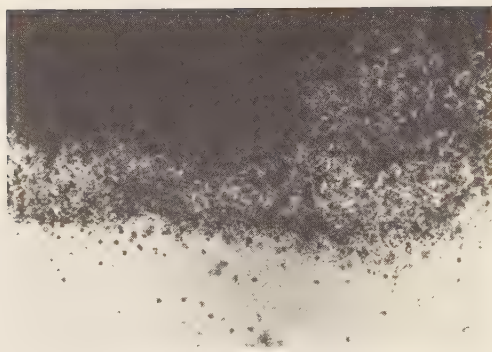


Abb. 79 a. Explantat aus der selben Reihe, nur Verdünnung 2 mg : 100 ml. Dichtes Epithel schiebt sich in einer zweidimensionalen Schicht vor. Original, 120 x

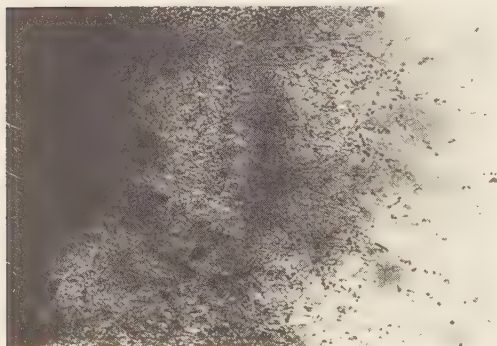


Abb. 79 b. Kontrolle, ohne Zusatz, zeigt ein dichtes Gewirr von Epithel- und Bindegewebszellen. Original, 120 x

sich folgende Reaktionen in den Wachstumszonen:

- 2 mg / 10 ml: Mäßig gehemmte, kleinzellige Proliferation
- 2 mg / 50 ml: Mäßig gehemmte bis starke Proliferation
- 2 mg / 100 ml: Die Kulturen zeigen alle Übergänge von der mäßig inhibierten Proliferation bis zu Kulturen mit gutem Wachstum in der Proliferationszone.

Auffallend starke Lyse des Mediums.



Abb. 80. Magenkultur (12 Tg) zeigt alle Übergänge von der Inhibition bis zur mäßig-guten Proliferation. Original, 120 x

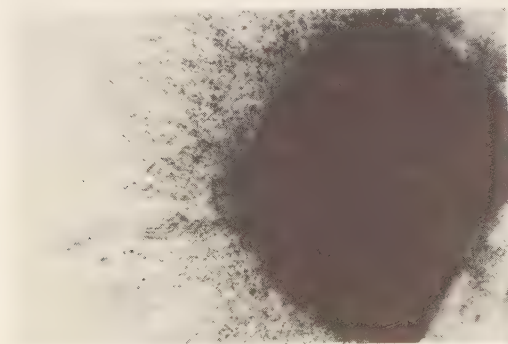


Abb. 80 a. Kontrolle, in der Zellproliferation nicht beeinflusst, läßt starkes, dichtes Magenepithel proliferieren. Original, 120 x

#### Versuchsreihe 6:

Mikrotröpfchen einer Konzentration von 2 mg MINOCYCLIN : 2 ml des (0,02 mg/gtt) obigen Lösungsmittels wurden sofort mit dem Ansatz den Testkulturen beigegeben. Als Testobjekte dienten Explantate der Epidermis und des Os frontale vom 12 Tage alten Hühnerembryo. Nach 4 Tagen Kulturzeit ergab sich bei beiden Geweben eine vollständige Inhibition.

#### Versuchsreihe 7:

Je 1 Mikrotröpfchen einer Substanzverdünnung von 0,5 mg MINOCYCLIN : 1 ml Lösungsmittel wurde mit (0,01 mg/gtt) den Explantaten der embryonalen Epidermis und der Milz vom 12 Tage alten Hühnerembryo konfrontiert.

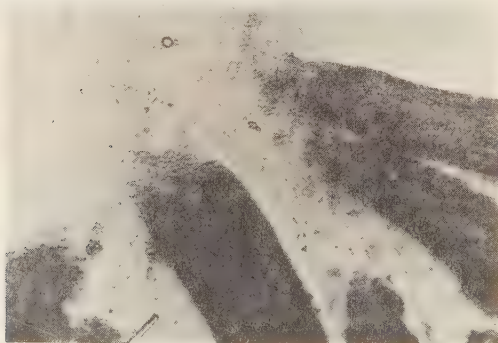


Abb. 81. Wenn man 1 Mikrotröpfchen einer Lösung von 0,5 mg MINOCYCLIN : 1 ml Lösungsmittel gibt, so erreicht man einen bemerkbaren Effekt : Federfollikel werden zerstört.

Original, 500'x



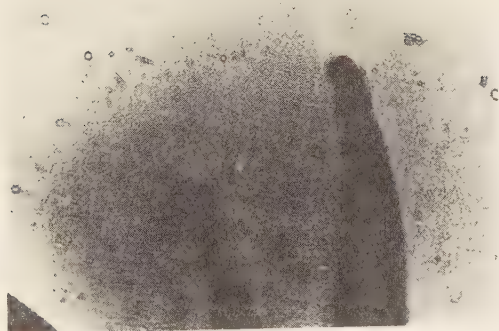


Abb. 81 a. Die Kontrollkulturen zeigten vollständig unverletzte Federanlagen.  
Original, 500 x

Bei der Haut reicht die Reaktion auffallenderweise von der vollständigen Inhibition bis zur vorsichtig sich hervorwagenden Epithelspitze. Bei den Milzexplantaten wurde die Proliferation deutlich inhibiert, was an der schmalen Wachstumszone der Testkulturen im Vergleich mit der wesentlich breiteren der Kontrollkulturen deutlich wird.

#### Versuchsreihe 8:

Epidermis vom menschlichen Foet, mens 4, wurde nach der Kultivationsmethode "Haus Hornheide" in HP + EE angesetzt und mit dem Medium Hornheide (s.o.) ernährt. In der 1. Passage wurde je 1 Mikrotröpfchen der Testsubstanz MINOCYCLIN zu dem Kulturmedium hinzugefügt. Folgende Verdünnungen wurden ausprobiert:

- 2 mg MINOCYCLIN : 200 ml Lösungsmittel
- 2 mg MINOCYCLIN : 300 ml Lösungsmittel
- 2 mg MINOCYCLIN : 400 ml Lösungsmittel



Nach 4 Tagen Kulturzeit, nach vorherigem Umsatz auf die Deckglaskultur, ergaben sich folgende cytologische Bilder bei den einzelnen Konzentrationen:

2 mg / 200 ml: Inhibition. Schlauchförmige Zellen und stark granulierte Rundzellen.  
Fibroblastenwachstum gehemmt.

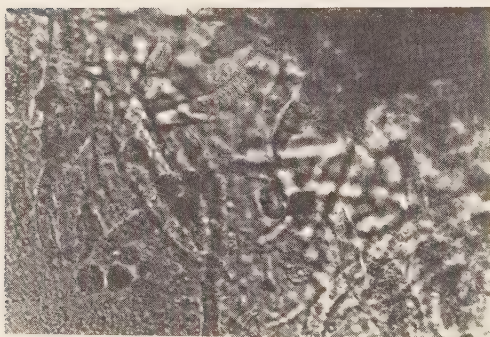


Abb. 82 . Foetalhaut, mens 4, wurde explantiert und zur Kultur angesetzt, dazu kam 1 gtt einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 200 ml Lösungsmittel. Schlauchförmige und stark granulierte Rundzellen bestimmen das Bild. Fibroblasten-Wachstum gehemmt.  
Original, 1200 x

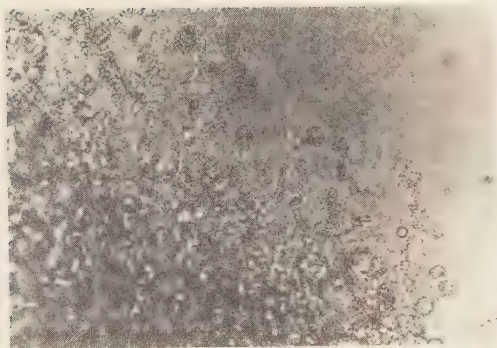


Abb. 82 a. Konzentrationsstufe 2 mg : 300 ml.  
Mäßig gehemmtes Wachstum.  
Original, 1200 x

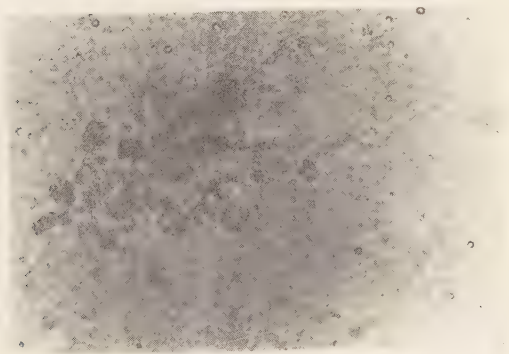


Abb. 82 b. Häufchen einer Kontrollkultur zeigt  
einige stark granulierte Zellen.  
Original, 1200 x



Abb. 83 . Hautexplantat + 1 Mikrotropfen einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 200 ml Verdünnungsmittel. Epithelproliferation gehemmt. Original, 500 x



Abb. 83 a. Vergrößerung zeigt säulenförmige Zellstruktur. Original, 2000 x

2 mg/300 ml: Mäßig gehemmtes Wachstum

2 mg/400 ml: Mäßig gehemmtes Wachstum, punktförmige  
Fibroblastenemigration

physiol.NaCl-Lösung: Mäßig-gute, ungehemmte Proliferation

Kontrollen: Mäßig-gute Zellvitalität

#### Versuchsreihe 9:

Bei einer Verdünnung von 2 mg MINOCYCLIN : 500 ml =  
0,004 mg/ml Lösungsmittel ergaben sich bei Explantatkul-  
turen vom 12 Tage alten Hühnerembryo pro gtt = 0,00008 mg  
= 0,08 µg folgende Resultate:

- a) Haut : zögernd, beginnende aber noch inhibier-  
te Zellproliferation
- b) Coronargefäße : Zögernd, beginnende, aber noch inhibier-  
te Zellproliferation, viele Cytolysefoci  
in der Wachstumszone.
- c) Os frontale : Geringe, inhibierte Zellvermehrung.

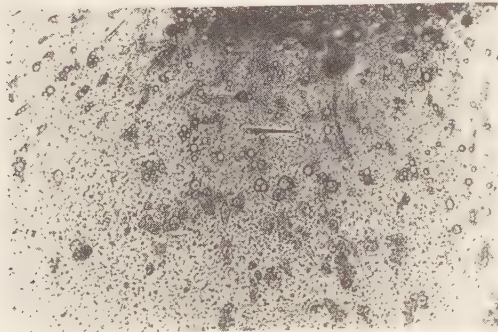


Abb. 84. Haut (12 Tg) nach Zugabe von 1 gtt von 2 mg  
MINOCYCLIN : 500 ml physiolog.Lösung. Starkes,  
aufgelockertes Zellwachstum.  
Original, 500 x

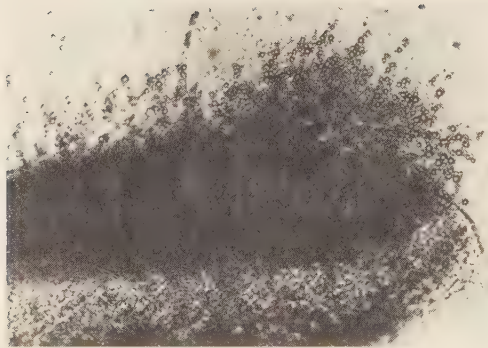


Abb. 84 a. Os frontale-Kultur nach Zugabe der gleichen Dosis. Nur mäßig-gehemmte Zellproliferation. Original, 500 x

Versuchsreihe 10:

Epidermis vom 12 Tage bebrüteten Hühnerembryo wurde im Plasma-Klotz (HP + EE) angesetzt. Dazu kam ein Mikrotropfen einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 1000 ml = 0,00004 mg/1 gtt physiolog. Kochsalzlösung. Nach 4 Tagen Kulturzeit ergab sich folgendes Resultat: Eine mäßig-gute, augenscheinlich noch etwas gehemmte Zellproliferation.



Abb. 85. Haut (12 Tg) wurde explantiert und zum Test angesetzt. 2 mg MINOCYCLIN : 1000 ml physiolog. Lösung zeigte einen noch sehr stark inhibierenden Effekt. Nur nekrotische Zellen. Original, 500 x

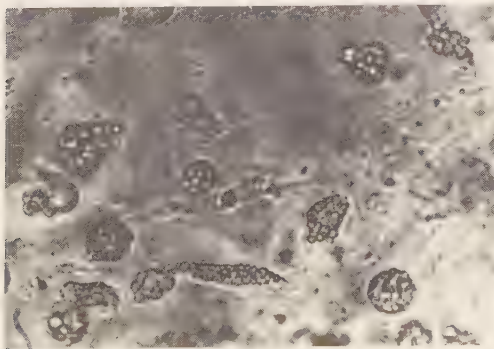


Abb. 85 a. Vergrößerung des obigen Bildes zeigt Rundzellen und fibrozytäre Zellen, angefüllt mit einer stark lichtbrechenden Substanz. Original, 2000 x





Abb. 86. Kontrollen zu diesen Kulturen.  
Starke Zellproliferation.  
Original, 500 x



Abb. 86 a. Desgleichen, nur vergrößert, zeigt  
Fibroblasten mit diffundierten Fett-  
partikeln.  
Original, 2000 x



### Versuchsreihe 11:

Hühnerembryonen, die 12 Tage im Brutapparat aus den befruchteten Eiern erbrütet wurden, lieferten für den Test mit MINOCYCLIN in einer Verdünnung von 2 mg : 1000 ml Lösungsmittel 2 µg/1 ml folgende Epithel- bzw. Bindegewebs-Explantate:

- a) Gallenblase,
- b) Niere,
- c) Os frontale,
- d) Koronargefäße.

Nach 4 Tagen Kulturzeit ergab sich folgendes cytologisches Bild:

- a) Gallenblase : Mäßig-gutes Wachstum von Gallenblasen-Epithel, aber starke Lyse des Mediums.

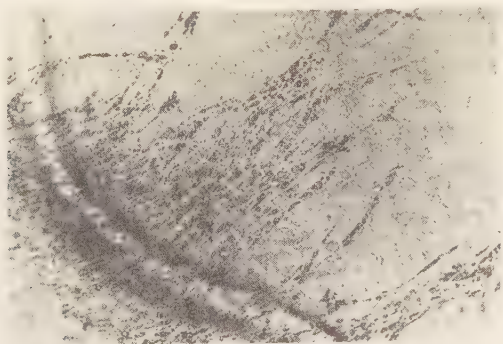


Abb. 87. Nieren-Explantat (12 Tg) wurde einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 1000 ml R-L-Lösung in gewohnter Weise appliziert. Gutes Wachstum von Nierenepithel. Original, 500 x

- b) Niere : Mäßiges, gehemmtes bis gutes Wachstum von Nierenepithel, starke Lyse des Mediums.

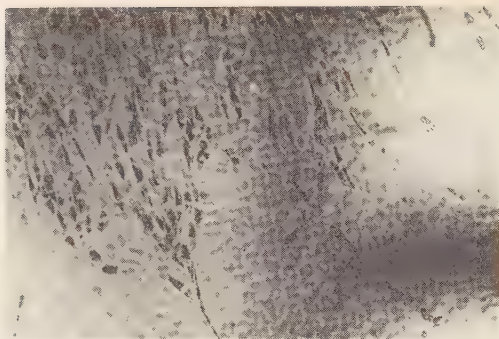


Abb. 88. Gallen-Explantat mit der gleichen Dosis angesetzt, ergab ebenfalls eine gute Emigration von Epithelzellen. Original, 500 x

c) Os frontale : Starke, ungehemmte Zellproliferation

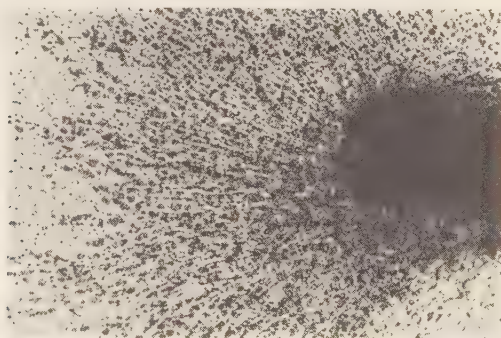


Abb. 89. Os frontale-Kultur nach Applikation einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 1000 ml Lösungsmittel. Sehr starke, ungehemmte Osteoblasten-Proliferation.

Original, 500 x

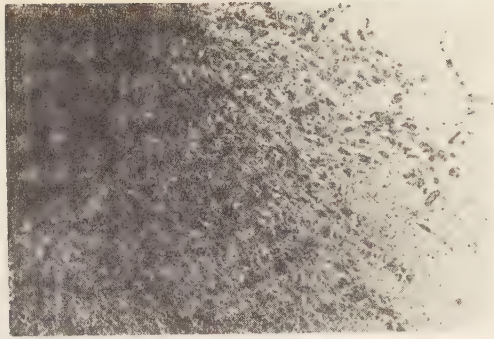


Abb. 89 a. Kontrolle zeigt ebenfalls ein ungehemmtes Zellwachstum. Original, 500 x

d) Koronargefäße: Starke augenscheinlich noch stimulierte Zellvermehrung.

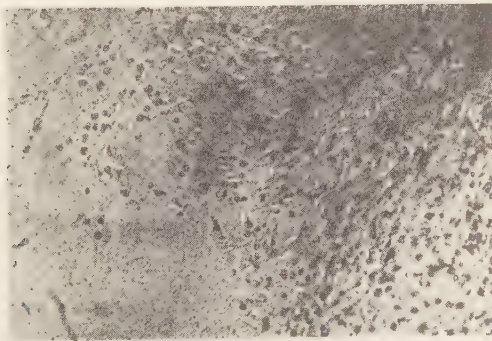


Abb. 90. Koronargefäß-Kultur mit der gleichen Dosis behandelt, zeigt das Bild einer ungehemmten, fast stimulierten Zellproliferation.

Original, 500 x

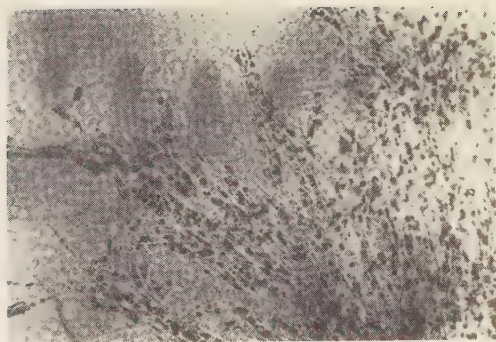


Abb. 90 a. Kontrolle ohne Zusatz, zeigt ein Bild zum Verwechseln. Original, 500 x

#### Versuchsreihe 12:

Lunge vom 12 Tage alten Hühnerembryo wird mit der Plasma-Extrakt-Methode angesetzt und sofort 1 Mikrotröpfchen einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 500 ml Lösungsmittel angesetzt.

Nach 4 Tagen Kulturzeit eine auffallend starke Lyse des Mediums und eine vollständige Inhibition jeglicher Zellproliferation.

#### Versuchsreihe 13:

Lunge vom 16 Tage alten Hühnerembryo wurde mit der Plasma-Extrakt-Methode angesetzt und erhielt zu dem Koagulum je 1 Mikrotröpfchen einer Testlösung von 2 mg MINOCYCLIN : 200 ml, 300 ml und 400 ml des Lösungsmittels.

Zu dem Ansatz wurde die Testlösung dazugegeben.

Nach 5 Tagen Kulturzeit ergaben sich folgende Reaktionen:

- a) 2 mg : 200 ml : Vollständige Inhibition
- b) 2 mg : 300 ml : Stase der Zellproliferation
- c) 2 mg : 400 ml : Stase der zellulären Proliferation.

Starke Lyse von Medium und Wachstumszone.

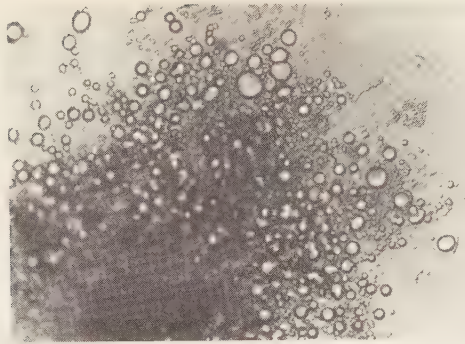


Abb. 91. Lungenexplantat (16 Tg) nach Ansatz mit 1 gtt einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 400 ml Lösungsmittel zeigt eine Aufblähung der Zellen durch diffundiertes Testmittel.  
Original, 1200 x

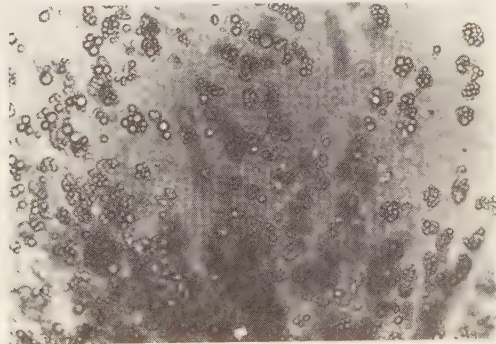


Abb. 91 a. Wachstumsrandzone mit vielen Epithelzellen.  
Kontrolle zu Abb. 91.  
Original, 1200 x

Versuchsreihe 14:

Lungenexplantate vom 14 Tage alten Hühnerembryo erhielten mit dem Ansatz eines Mikrotröpfchen einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 1000 ml Lösungsmittel. Nach 4 Tagen Kulturzeit zeigten die Explantate eine gute Zellproliferation, obwohl eine überstandene anfängliche Hemmung erkennbar war. Dazu kam eine ausgeprägte Lyse des Nährmediums und der Wachstumszone.

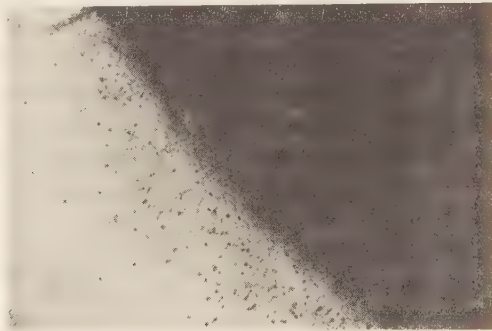


Abb. 92. Lungenexplantate (14 Tg) nach Zusatz 1 gtt einer Lösung von 2 mg MINOCYCLIN : 1000 ml Lösungsmittel. Feinfädige aufgelockerte Proliferation.

Original, 200 x



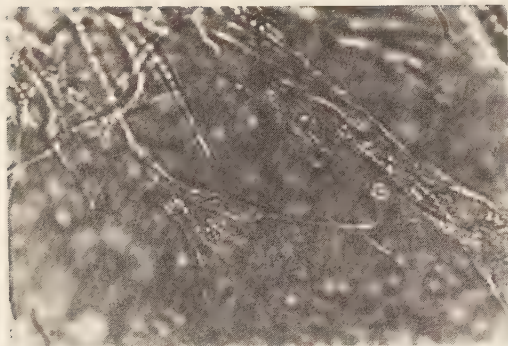


Abb. 92 a. Zellen der Wachstums-Randzone eines Lungenexplantats mit starker Speicherung einer stark lichtbrechenden Substanz. Original, 2000 x

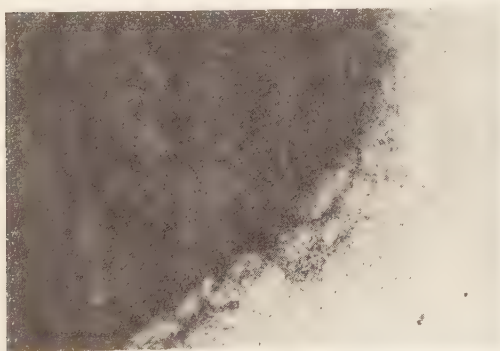


Abb. 92 b. Kontrollkultur ohne Zusatz läßt eine geschlossene Emigration von feinfädigen Epithelzellen erkennen.  
Original, 200 x



Die Kontrollen ohne Zusatz der Testsubstanz wiesen ein stärkeres Zellwachstum und eine geringe bis keine Lyse des Mediums auf.

Das Resultat der bisherigen Versuchsreihen:

Starke Bindung des MINOCYCLINS an die DNS der Zellen und dadurch verzögerte Mitose bzw. Inhibition. -

| Ausgangskon-<br>zentration<br>MINOCYCLIN | Konzentration<br>pro ml<br>Lösungsmittel | Dotations-<br>konzentration<br>pro<br>Kultur in<br>µg |
|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 2 mg : 10 ml phys.                       | 0,2 mg : 1 ml                            | 4 µg                                                  |
| 2 mg : 50 ml Lösg.                       | 0,04 mg : 1 ml                           | 0,8 µg                                                |
| 2 mg : 100 ml "                          | 0,02 mg : 1 ml                           | 0,4 µg                                                |
| 2 mg : 2 ml "                            | 1,0 mg : 1 ml                            | 20,0 µg                                               |
| 0,5 mg : 1 ml "                          | 0,5 mg : 1 ml                            | 10,0 µg                                               |
| 2 mg : 200 ml "                          | 0,01 mg : 1 ml                           | 0,2 µg                                                |
| 2 mg : 300 ml "                          | 7 µg : 1 ml                              | 0,14 µg                                               |
| 2 mg : 400 ml "                          | 5 µg : 1 ml                              | 0,1 µg                                                |
| 2 mg : 500 ml "                          | 4 µg : 1 ml                              | 0,08 µg                                               |
| 2 mg : 1000 ml "                         | 2 µg : 1 ml                              | 0,04 µg                                               |

Diese Tabelle gibt die Ausgangskonzentration an und zeigt den Gehalt an MINOCYCLIN im Testtropfen.  
(1 gtt = 0,02 ml = 1 Mikrotropfen von 0,02 ml)

| Testgewebe     | 1 gtt-Konzentration von "MINOCYCLIN" |                                   |      |      |     |      |      |      |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------|------|-----|------|------|------|
|                | 20                                   | 10 <sup>=</sup> / <sup>ug</sup> 4 | 0,8  | 0,4  | 0,2 | 0,14 | 0,08 | 0,04 |
| Epidermis (12) | ----                                 |                                   |      |      |     |      |      |      |
| Os front.      | ----                                 |                                   |      |      |     |      |      |      |
| Epidermis      |                                      | ----                              |      |      |     |      |      |      |
| Milz           |                                      | ----                              |      |      |     |      |      |      |
| Kardialmusk.   |                                      | --                                | -(+) | ++   |     |      |      |      |
| Leber          |                                      | --                                | --   | -(+) |     |      |      |      |
| Haut           |                                      | -(+)                              | ++   | +++  |     |      |      |      |
| Haut           |                                      | --                                | -(+) | -+   |     |      |      |      |
| Magen          |                                      | -(+)                              | -+   | +    |     |      |      |      |
| Haut           |                                      |                                   |      |      |     | ++   | ++   |      |
| Koronargef.    |                                      |                                   |      |      |     |      | ++   |      |
| Os front.      |                                      |                                   |      |      |     |      | ++   |      |
| Epidermis      |                                      |                                   |      |      |     |      | ++   |      |
| Gallenblase    |                                      |                                   |      |      |     |      |      | +++  |
| Nieren         |                                      |                                   |      |      |     |      |      | +++  |
| Os front.      |                                      |                                   |      |      |     |      |      | ++++ |
| Koronargef.    |                                      |                                   |      |      |     |      |      | ++++ |
| Lunge          |                                      |                                   |      |      |     |      | ---  |      |
| Lunge          |                                      |                                   |      |      | --- | ++   |      | +++  |

Tabelle 17. Proliferationstendenz nach "MINOCYCLIN"-Gabe

- Diskussion:
- 1) Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren
  - 2) Wie kann man sich den Metabolismus der Antibiotika in Kultur vorstellen?
  - 3) Die Ergebnisse der Wirkung von Antibiotika auf embryonale und erwachsene Tiere  
(im Gegensatz zu Literaturangaben in der Kultur)

- 1) Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren

Nicht Testkeime wurden hier zur Toleranzbestimmung herangezogen, sondern embryonale Gewebe und Zellen.

Die einzelne Zelle ist in ihren verschiedenen Lebensstadien nicht gleichbleibend empfindlich. In Mitose befindliche Zellen sprechen viel empfindlicher als ruhende Zellen, mit reduzierter Zellproliferation und geringem Zellstoffwechsel, auf Milieustörungen, wie hier den zugesetzten Antibiotika, an. Ruhende Zellen werden erst durch höhere Konzentrationen, z.B. des Penicillins, angegriffen als embryonale mit häufiger mitotischer Teilung. (1)

#### PENICILLIN-G.

Embryonale Gewebe vom 9 Tage bzw. 12 Tage alten Hühnerembryo proliferierten unter PENICILLIN-G-Dosen ganz unterschiedlich. Das Antibiotikum PENICILLIN löst bei unterschiedlichen Konzentrationen dosisabhängige Effekte aus.

- a) Konzentrationen zwischen 10 und 70 i.E./ml stimulieren eindeutig das Fibroblastenwachstum, die Osteoblastenproliferation und die Emigration von Epithelzellen in die Wachstumszone.  
40 i.E. ist der Mittelwert, der vollkommen unschädlich

ist und gute bis sehr starke Wachstumsbewegungen stimuliert.

- b) Konzentrationen zwischen 80 und 100 i.E./ml hemmen eindeutig jede bakterielle Kontamination, werden aber vom embryonalen Gewebe toleriert.
- c) Konzentrationen zwischen 150 und 500 i.E./ml werden bei kurzfristiger Applikation noch von den Geweben toleriert, führen aber bei langdauernder Anwendung zu Hemmungen der Mitose, die als reversible "Mitosis retardata" zu bezeichnen ist. Kennzeichnend für dieses Stadium ist das Auftreten pathologischer Zellformen.
- d) Konzentrationen zwischen 1 000 und 10 000 i.E./ml führen zur völligen Irreversibilität der Mitose. Schon ein Verweilen von Explantaten über 4 Stunden in einer Waschlösung, die PENICILLIN in diesen Dosen enthält, führt zur Inhibition der Mitose.
- e) Konzentrationen in der Stärke der therapeutischen Anwendung beim Menschen, 20 000 bis 200 000 i.E./ml führen zu zytotoxischen Wirkungen.

Diese Ergebnisse mit PENICILLIN sind deshalb so wichtig, weil dieses Antibiotikum das am häufigsten in der Gewebekultur angewendete Antibiotikum darstellt. Es wird meist als PENICILLIN-G mit Endkonzentrationen zwischen 50 und 100 i.E./ml verwendet. Bei diesen Konzentrationsstufen ist es für alle Zellgewebe und Zelltypen vollständig harmlos, nur für Bakterien ist es selektiv-toxisch. Im Falle einer bakteriellen Kontamination der Testgewebe wird es nötig sein, Waschlösungen mit 1 000 i.E./ml zu verwenden. Werden die Testgewebe aber länger als 6 Stunden in der Waschlösung aufbewahrt, dann ist die bakterielle Verseuchung ausgeschaltet, aber bei den Geweben ist ein profunder Mitosestop durch das Antibiotikum eingetreten. Durch die Wirksubstanz muß in der Zelle, hier

der tierischen Zelle, ein lebensnotwendiger Vorgang blockiert worden sein. Antibiotika wirken auf den Stoffwechsel der Nukleinsäuren und Proteine oder auf die Synthese der Bakterienwände, aber bei embryonalen tierischen Zellen scheinen sie auch in die DNA- oder RNA-Synthese einzugreifen, wie das von Mitomycin C, Aktinomycin, Daunomycin oder Puromycin bei Warmblüterzellen bekannt ist.(2) Diese Reaktionen des PENICILLINS an embryonalen Zellen in der Kultur rechtfertigen die weiteren Untersuchungen. Von den zitierten Autoren ergaben deren Ergebnisse ein unterschiedliches Bild. Als absolute Pflicht bei diesen Untersuchungen mußte die Sterilität garantiert sein, aber ohne Zusatz von PENICILLIN, das ein beliebtes Mittel zur Verhinderung jeglicher bakterieller Kontamination darstellt. Nur dadurch war es uns möglich, mit den geringsten Konzentrationen wirksame Zelleffekte und Zellreaktionen zu erzeugen.

Den hier aufgezeigten Untersuchungen liegt der Gedanke zu Grunde, durch ein Antibiotika-Metaboliten-Konzept, Komponenten in lebenden Zellen zu finden, die die Mitose inhibieren. Die Auffindung dieses oder der bestimmten Metaboliten wäre ein Teil der hier geforderten Aufgabe. -

Über die PENICILLIN-Wirkung auf embryonale Gewebe sind mehrere Publikationen erschienen, die entweder alle, nur einzelne oder keine Fakten der eigenen Untersuchungen bestätigen.

Die ungefährlichste Dosis, um ganz sicher bei den Gewebekulturen zu gehen, ist 50 µg/ml (3); auch ein Ergebnis unserer Untersuchungen.

Schon im Jahre 1941 wurde auf die Zytotoxizität des PENICILLINS hingewiesen (4), die zu Wachstumshemmungen und Veränderungen der Zellmorphologie führte. Wenn PENICILLIN zum Ansetzen von Kulturen verwendet wird, so sollte man nie über 50 - 100 i.E./ml hinausgehen. (5) Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen. Die Notwendigkeit der genauen Untersuchung der Zytotoxizität war notwendig,

weil viele unterschiedliche Angaben vorliegen.

Auf die Möglichkeit einer Wachstumsstimulierung durch kleine Dosen des Antibiotikums wurde schon 1957 hingewiesen. (6) Wenn der Antibiotikaschutz des PENICILLINS für die Verarbeitung von Frischzellen oder Gewebefragmenten vom Menschen nicht ausreicht, so müssen Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracycline hinzugezogen werden. Diese Antibiotika ermöglichen meist erst die Kultur von Geweben, die durch bakterielle Kontamination verunreinigt sind.

50 - 100 i.E. PENICILLIN-G erhöhen nicht den pH-Wert der Tyrode-Lösung. Die Aktionen des PENICILLINS auf normale und maligne Zellen wurden von verschiedenen Autoren beschrieben. (7 - 9a)

Unter sterilen Kautelen, besonders abgeschirmt von jeglicher Kontamination, wurden die Explantate entnommen, ohne jeglichen Zusatz von Antibiotika zu den Waschlösungen für die Gewebefragmente. So wurde die Basis aufgebaut für diese Arbeiten über die Zytotoxizität der Antibiotika in vitro.

Wenn PENICILLIN-G mit einer Endkonzentration von 20 - 50 i.E. pro ml Nährmedium angewendet wird, so ist es vollkommen harmlos für das Gewebe. (10) Menschliche Haut reagiert in vitro auf 1 000  $\mu\text{g/ml}$  mit einer Depression der Mitose (11); eine komplette Inhibition erfolgt nach Dotation von 10 000  $\mu\text{g/ml}$ . Werte zwischen 600  $\mu\text{g}$  bzw. 6 000  $\mu\text{g}$  pro ml weisen keine eindeutige Reaktion auf. (12)

Wo verbleibt das PENICILLIN, das den Testkulturen zugesetzt wird? Nach unseren bisherigen Erfahrungen wird das gesamte PENICILLIN ähnlich wie im Organismus an das Plasma-Albumin der Testgewebe im unterschiedlichen Grade gebunden. In vivo wird es zu 65 % an das Plasma-Protein gebunden. (13) Unter normalen Bedingungen wird das PENICILLIN-G schnell durch den Organismus ausgeschieden, (14) aber in der Primo-Kultur kommt es zu keiner Exkretion.

1. 在工业生产中，由于生产过程的复杂性和多变性，生产计划往往难以准确预测。因此，企业需要建立一套科学的生产计划编制体系，以提高计划的准确性和可操作性。

2. 生产计划的编制应遵循以下原则：

- （1）科学性：生产计划的编制应基于科学的方法和手段，充分考虑生产过程中的各种因素，如市场需求、生产能力、资源状况等。
- （2）可操作性：生产计划应具有可操作性，能够指导生产活动的顺利进行。
- （3）灵活性：生产计划应具有灵活性，能够根据市场变化和实际情况及时调整。
- （4）协调性：生产计划应与其他计划（如销售计划、采购计划等）相协调，确保企业整体运营的顺畅。

3. 生产计划的编制流程如下：

- （1）收集数据：收集生产过程中的各种数据，包括历史生产数据、市场需求数据、资源状况数据等。
- （2）分析数据：对收集到的数据进行分析和处理，找出生产过程中的规律和趋势。
- （3）制定计划：根据分析结果，制定生产计划，明确生产目标、生产任务、生产进度等。
- （4）审批计划：将制定好的生产计划提交给相关部门审批，确保计划的可行性和合理性。
- （5）执行计划：按照审批通过的生产计划，组织生产活动，确保计划的顺利实施。
- （6）监控计划：在生产过程中，实时监控计划的执行情况，及时发现和解决问题。
- （7）评估计划：定期对生产计划的执行情况进行评估，总结经验教训，为今后的计划编制提供参考。

4. 生产计划的编制应注意以下几点：

- （1）明确生产目标：生产计划的编制应明确生产目标，包括产量、质量、成本等。
- （2）合理分配资源：生产计划的编制应合理分配资源，确保生产活动的顺利进行。
- （3）加强沟通协调：生产计划的编制应加强沟通协调，确保各部门之间的信息畅通。
- （4）注重计划的可操作性：生产计划的编制应注重计划的可操作性，确保计划能够指导生产活动的顺利进行。

5. 生产计划的编制是企业生产管理的重要环节，企业应高度重视生产计划的编制工作，建立科学的生产计划编制体系，提高生产计划的准确性和可操作性，为企业的可持续发展提供有力保障。





ung von Nekroseloci zu erkennen. Zellen, die abgestorben waren und kraft ihrer Ballung im Nierenepithel toxisch auf die gesamte Epithelmembran wirkten, so daß durch diese toxische Kumulation und eine fermentative Lyse eine Zerstörung der Wachstumszone die Folge war. Auf therapeutische Dosen reagiert der Hypothalamus und besonders das Neurosekretionssystem mit einer Stimulation, die sich in einer Vergrößerung der Zellkörper und der Neuronenkerne sowie in einer Mengenzunahme des Neurosekrets äußert. (21)

Antibiotika wirken aber auch toxisch auf die großzelligen Kerne des Hypothalamus, was sich an der Dystrophie, an Schwumpfung und Zerfall der Neuronen zeigt.

Der Zusatz von Antibiotika, in für die Gewebe therapeutischen Dosen ist für die Zell- und Gewebekultur eine wertvolle Neuerung von großer praktischer Bedeutung. (22) Aber diese Untersuchungen zeigen, daß sie auch beträchtliche Schäden verursachen können. -

Mit der Applikation des PENICILLINS in das Explantat setzt auch seine Elimination im weitesten Sinne ein, nach Fixation im Gewebe, chemischem Ab- und Umbau, Rückdiffusion aus dem Gewebe in das Medium - nicht in das Blut wie beim Organismus. Eine Ausscheidung der Abbauderivate findet erst beim Umsetzen in ein neues Medium statt.

So unterscheidet sich die Gewebekultur vom Organismus.

PENICILLIN ist ein ausgesprochenes Neurotoxikum, das beim Organismus nur deswegen nicht in Erscheinung tritt, weil infolge der Blut-Liquor-Schranke sehr geringe Mengen in das Gehirn übertreten. (23) Am Gehirnexplantat dagegen werden starke zytotoxische Reaktionen in Form von lytischen Prozessen und Zellnekrosen offenbar.

In unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß 50 i.E. keinen zytotoxischen Effekt an den Kulturen hinterlassen, was von anderen Autoren ebenfalls bestätigt wurde. (24)

PENICILLIN tötet Bakterien schon in Konzentrationen von

0,1 i.E./ml - 0,5 i.E./ml. Nach von uns widerlegten umstrittenen Untersuchungen sollen 5000 i.E. pro ml tierische Gewebekulturen nicht abtöten und über 1 Million i.E./ml bei Injektion vom Tier noch toleriert werden. (25)

Die Penetration der Antibiotika in gram-negativen Bazillen wird anschaulich gezeigt und könnte auch für die embryonale Zelle, die durch die toxische Dosis inhibiert wird, gelten. (26)

Antibiotika sind biologisch aktive Substanzen und die Möglichkeit, daß sie in das Verhalten der kultivierten Zellen und Gewebe eingreifen könnten, ist nicht von der Hand zu weisen. Gewisse Konzentrationen von Antibiotika, und das bestätigen die hier vorgelegten Ergebnisse eindeutig, haben keinen merkbaren Effekt auf die Gewebe; in diesem Falle sind sie nur zur Sicherheit gegen eine Kontamination verwendet worden.

Diese Sicherheits-Konzentration ist 50 µg/ml. (27)

Zum Abschluß dieser Übersicht über das Für und Wider der PENICILLIN-Dotierung in der Zell- und Gewebekultur hier noch einige Autoren, die auch über die PENICILLIN-Wirkung auf embryonale Gewebe ihre Erfahrungen im Experiment gemacht haben und jeder für sich oder alle gemeinsame zu den gleichen Schlüssen wie wir oder auch anderen in ihren Arbeiten kamen.

Die Reihe beginnt mit einer Abhandlung über die Mitose in der Gewebekultur und ihre Inhibition durch PENICILLIN. (28)

In der Gewebekultur wird durch die Zugabe einer Testsubstanz, hier des PENICILLINS, oft eine anomale Reaktion eingeleitet, die ohne die Dotation dieser Substanz nie eingetreten wäre. Schon früh, nach der Einführung des PENICILLINS in die Humantherapie, begannen Versuche, den Metabolismus dieser Substanz in Kultur zu ergründen. Dabei fiel auf, daß das PENICILLIN die Mitose beeinflußt. (29)

In weiteren Untersuchungen werden die PENICILLINE unterschiedlicher Herstellung miteinander verglichen.

(29a und 29b)

In den dann folgenden Untersuchungen konnte die Spezifität der Dosierung des PENICILLINS für die Gewebekultur festgestellt werden. (29c - 29d) Diese Untersuchungen dienten als Grundlage für unsere Untersuchungen mit PENICILLIN-G. Die Wirkung von PENICILLIN wurde sowohl an Kulturen von normalen als auch malignen Zellen ausgetestet. (30)

Die Toxizität der Antibiotika auf Gewebekulturen war der Titel von ausführlichen Arbeiten ebenfalls an normalen und malignen Zellen. (31) Die Zytotoxizität der bakteriziden Substanz auf die Lymphknoten der Mammalier war das Thema für weitreichende Untersuchungen. (32) Auch der Gedanke, daß die Temperatur einen Einfluß auf die Aktion des PENICILLINS in vitro haben müßte, wurde experimentell untersucht. (33)

Über die Verwendung des PENICILLINS als Mittel zur Erleichterung der Kultivierung von Zellen und Geweben in vitro arbeiteten viele Experimentatoren. (34) Die zytotoxischen Aktivitäten verschiedener Antibiotika, besonders des PENICILLINS im Hinblick auf den Metabolismus der Substanzen und die Inhibition durch sie, wurde versucht darzustellen. Aber oft konnten keine direkten Beziehungen zwischen den inhibitorischen Aktivitäten des Agens festgestellt werden, die ein Maß für die verschiedenen Aspekte der Zellinhibition sein könnten. (35) Wurden Eier und Gewebekulturen mit Sputum kontaminiert und verunreinigt, so konnte diese bakterielle Verseuchung der Gewebekulturen durch PENICILLIN-Behandlung beseitigt werden. (36) Mit zunehmender Konzentration des Antibiotikums tritt proportional eine Steigerung des Hemmeffektes auf. (37) Mit der weitverbreiteten Anwendung der Antibiotika in der Gewebekultur ist es von uneingeschränkter Wichtigkeit, über die Effekte dieser Substanzen auf die individuelle Zelle etwas mehr zu erfahren. Ein ideales Antibiotikum muß drei gestellte Forderungen erfüllen: Es darf nicht toxisch sein in Konzentrationen, die dazu bestimmt sind, bakterielle Kontaminationen zu inhibieren. Es darf das

Wachstum nicht verzögern, und es muß leicht in das Kulturmedium inkorporierbar sein. (38)

Die Bindung des PENICILLINS durch den Organismus und durch Homogenisate von Organen wurde hinreichend untersucht. (39) Eine gewisse Korrelation zwischen der Menge des PENICILLINS, gebunden und konzentriert auf einen Organismus oder ein Organ und seine Sensitivität, untersuchte u.a. auch EAGLE. (40)

Die Wechselwirkungen des Benzylpenicillins mit Gewebekulturen wurde eingehend untersucht. Dabei wurde herausgefunden, daß die Faktoren Zeit und Temperatur determinierend waren für die entarteten Zellen. Eine lineare Beziehung konnte zwischen der Abnahme der Aktivität des PENICILLINS und der Inkubationstemperatur festgestellt werden. Die Abnahme betrug 40 - 60 % des Originalwertes. Auch bei einer Erhöhung der Originalkonzentration von 2 bis 1 000 E./ml gab es keine Veränderungen. (41)

PENICILLIN wird in der Bakterienzelle irreversibel konzentriert, in der embryonalen Organzelle dürfte ein ähnlicher Status vorliegen, das verbindende Agens stellt eine nicht dialysierte und unlösliche Lipidlösung dar. Die Bindung von PENICILLIN im Organismus und Zellextrakten von Organen wurde durch EAGLE untersucht. Er fand eine Korrelation zwischen der Menge des gebundenen PENICILLINS und Konzentrationen im Organismus und seiner Sensitivität.

Zerstörte Zellen binden die gleiche Menge des Wirkstoffes wie intakte Zellen. Permeabilität war nicht der entscheidende Faktor. Die Bindungskomponente ist mit einer Lipidfraktion assoziiert, die dicht an der Zellwand liegt und das Bindungsagens darstellt. PENICILLIN soll weiter eine fehlerhafte Funktion der osmotischen Barriere bewirken. (42)

Am lebenden embryonalen Herzgewebe wurden Antibiotika ausgetestet. Herzgewebsfragmente vom 12 Tage alten Hühnerembryo wurden verwendet, 0,5 - 1,0 mm im Durchmesser.



PENICILLIN-G verbindet hohe Potenz der germiziden Effizienz mit geringer Gewebetoxizität. (43)

Die toxischen Effekte verschiedener PENICILLINE auf humane Amnionzellkulturen waren bei verschiedenen PENICILLIN-Derivaten sehr unterschiedlich, z.B. Penicillin-G = zytopathische Effekte auf Human-Amnion-Zellen bei 2,7 mg/ml Nährlösung. Penicillin V bei 2,2 mg/ml, bei 50 % der Gewebekulturen. Mit geringeren Konzentrationen der Penicilline konnten Effekte erzeugt werden, die auch bei unseren Untersuchungen deutlich zu Tage traten. Auf eine geringe intensive Granulation entstand in den Kulturen nach 24 Stunden eine deutlich hervortretende Abrundung der Zellen, die sich mit weiteren 24 bis 48 Stunden Kulturzeit noch intensivierten.

Fibroblasten-ähnliche Zellen wurden vollständig rund, besonders nach 3 Kulturtagen. An gefärbten Präparaten der mit Penicillin behandelten Kulturen konnten starke Veränderungen entdeckt werden. Das Chromatin verklumpte, und es konzentrierte sich an der Peripherie. Hohe Konzentrationen der Penicilline erzeugten eine Pyknose. Zytoplasmatische Vakuolen resultierten aus dieser Konfrontation. (44)

Die Wechselwirkungen des Benzylpenicillins mit embryonalen Hühnerfibroblasten wurden untersucht. Variationen der Penicillin-Aktivität unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Temperatur, Zeit) wurden nach der Inkubation bestimmt.

Eine lineare Beziehung wurde zwischen der Abnahme der Aktivität des Benzylpenicillins und der Inkubationstemperatur festgestellt. Die Aktivität beschränkt sich auf 40 - 60 % des ursprünglichen Wertes nach 24 Stunden. Bei Konzentrationen von 2 bis 1 000 E./ml wurden Veränderungen kaum bemerkt. (45)

Der Flächenzuwachs von Kulturen von Hühnerfibroblasten unter Verwendung von Embryonalextrakt oder von Ringer-Lösung mit Zusatz von Penicillin war fast gleich groß. Mit gutem Erfolg wurden sowohl 3 als auch 30 E. Penicillin

je Kultur angewendet. Hier muß bemerkt werden, daß unsere eigenen Untersuchungen zu einem gleichen Ergebnis kommen. Der wachstumsfördernde Anteil des Penicillins bleibt auch unter Verwendung von Natrium-Penicillinat oder nach Behandlung des Antibiotikums mit Penicillinase erhalten, so daß die antibiotische und die wachstumsfördernde Komponente nicht identisch sein dürften. - (46)

Reines PENICILLIN ist bei einer Konzentration von definitiv 1 : 6 000 für Hühnerfibroblasten toxisch. Eine Konzentration größer als 1 : 6 000 über 48 Stunden war notwendig, um irreversible Schäden an den Zellen zu verursachen. Nach der Aussage des Autors soll PENICILLIN in antibakteriellen Konzentrationen auf keine Art und Weise die Migration oder das Wachstum von Lymphozyten, Fibroblasten oder Macrophagen hemmen. (47)

Hier nun eine genaue Angabe der Penicillin-Einheiten:

1 i.E. = 0,6 µg kristallines Natrium-Penicillin-G  
1 µg = 1,67 i.E., 1 mg = 1667 E.

PENICILLIN tötet verschiedene Bakterienstämme mit Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 i.E./1 ml ab. Konzentrationen von 5 000 i.E./ml sollten tierische Gewebekulturen nicht abtöten und 1 Million E./kg wird bei der Injektion bei Tieren von diesen toleriert, behauptet WORK. (48) Eine Nachprüfung in dieser Arbeit hat ergeben, daß auch schon 5 000 i.E./ml eine tiefe Depression in den Geweben hinterlassen, die irreversibel ist.

Eine immunologische Untersuchung zeigte, daß das Penicilloylhaptan fest mit dem Nierengewebe verbunden ist. (49)

Mit der Methode der "Cytoanalyse" werden latente Zellschädigungen beim Menschen durch PENICILLIN-G nachgewiesen. Wangenschleimhaut wird mit dem scharfen Löffel abgeschabt, Zellmaterial in TYRODE-Lösung in einem Hohlschliff-Objektträger aufgeschwemmt und luftdicht abgeschlossen. Danach 2 Stunden bei 37 Grad C bebrütet. Ausstreichen, Fixieren in Methylalkohol und Giemsa-Färbung.



Nach Pinselung der Wangenschleimhaut mit **PENICILLIN** finden sich im Ausstrich-Präparat "typisch Penicillin-veränderte Zellen". Die Kerne der Epithelzellen sind unscharf in ihrer Kontur, aufgelockert, ja zerfallen. Das Plasma erscheint hell und aufgequollen, bei längerer Bebrütung als 2 Stunden verschwinden die aufgelockerten Kerne. Es sind dann nur noch Kerntrümmer sichtbar. Zusätze von **PENICILLIN** zum Tyrode-Bad ergaben keine Zellschäden. (50)

Toxische Wirkungen auf die Großhirnrinde, das Rückenmark, die Meningen und die peripheren Nerven nach Anwendung von **PENICILLIN** sind von verschiedenen Seiten beschrieben worden. Sogar das Auftreten einer lokalisierten Neuritis nach intramuskulärer Penicillinapplikation. (51)

Von anderer Seite wird nun eine ganz andere Erklärung zu der Penicillin-Wirkung ins Feld geführt. Es besteht wahrscheinlich kein direkter Einfluß des Penicillins, sondern die Schäden werden durch Stoffe hervorgerufen, die unter der Einwirkung des Penicillins im Gewebe entstehen. Diese Ansicht spräche für eine Metabolisierung des applizierten Penicillins. (52)

Die Penicillin-Toleranz ist beim Meerschweinchen noch geringer. Es besteht eine relativ große Penicillinsensibilität. (53)

Am Kaninchenfibrocyten bewirkten 100 - 1 000 Original-Einheiten **PENICILLIN** "Lilly" ein Ansteigen der Mitosezahlen. Zytotoxische Wirkung in Kultur tritt bei einer wenigstens 100-fachen stärkeren Konzentration ein, als die für einen therapeutischen Effekt notwendigen Konzentrationen im Blut nach den Literaturangaben besteht. = 0,1 i.E./ml Serum. Immerhin sollte man sich bei den intramuskulär verabreichten sehr hohen Dosen (5 000 i.E.) über die cytotoxische Wirkung Rechenschaft geben. (54)

Zahlreiche Untersucher haben die Gewebekultur-Technik dazu benutzt, durch die Testung mit Antibiotika die potentielle Toxizität festzustellen. **PENICILLIN** ist relativ nicht-toxisch bei Kaninchen-Lymphknoten-Zellen, normalen und Tumorzellen von Ratten und Kaninchen und von Hunde -

Fibroblasten. Zwei wichtige Faktoren scheinen Einfluß auf den Grad des Wachstums von den Gewebekultur-Explantaten zu bestimmen: Das individuelle Wachstumspotential des Gewebes selbst und die Konsistenz des Plasma-Extrakt-Gels. War es nicht fest, so war das Auswachsen sowohl bei Haut-Explantaten als auch der Chicken-Milz reduziert. (55)

Der Vorteil der Gewebe-Kultur in der Analyse der Wirkungen von PENICILLIN ist klar, denn es ist eine Methode zur Untersuchung des direkten Effektes der Zellen und Gewebe in Abwesenheit des komplexen Metabolismus des ganzen tierischen Organismus. -

Literaturverzeichnis : Diskussion. 1) PENICILLIN.

- (1) HENNEBERG, G. : Einführung in die bakteriologische Untersuchungstechnik zur Penicillintherapie.  
G. Fischer, Jena, 1949
- (2) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen.  
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 1971
- (3) MOSCONA, A. Methods.  
TROWELL, O. A. in WILLMER, E. N.: Cells and  
and WILLMER, E. N. : tissues in culture, Vol. I, chapter 2. Academic Press, 1965,  
London, New York
- (4) ABRAHAM, E. P. Further observations on penicillin.  
CHAIN, E. Lancet II, 177-188 (1941)  
HEATLEY, N. G.  
and JENNINGS, M. A. :
- (5) PARKER, R. C. : Methods of Tissue Culture.  
Third Edition, Haper & Row, New York 1961
- (6) ARANDA, R. S. Effects of antibiotics on tissue  
FERNANDEZ, E. M. cultures. Penicillin and Dihydro-  
and FUERTES, A. M. : streptomycin. Arch. Inst. farm.  
(Madrid) 9, 143-157 (1957)
- (7) HERRELL, W. E. Tissue culture studies on cytotoxicity of bactericidal agents.  
and HEILMAN, D. H. : I. Effects of Gramicidin, Tyrocidine and Penicillin on cultures of mammalian lymph nodes.  
Am. J. Med. Sci. 205, 157-162 (1943)

- (7a) HERRELL, W.E.  
and HEILMAN, D.H. : Tissue culture studies on cyto-  
toxicity of bactericidal agents.  
III. Cytotoxicity and antibac-  
terial activity of Gramicidin  
and Penicillin : Comparison  
with other germicides.  
Am.J.Med.Sci.206,221-226 (1943)
- (8) CORNMAN, I. : A selective lethal effect of  
penicillin on sarcoma cells  
growing with normal tissue  
in roller tube cultures.  
J.Gen.Physiol.28,113-118 (1944/45)
- (8a) CORNMAN, I. : Survival of normal cells in  
penicillin solutions lethal  
to malignant cells.  
Science 99,247+ (1944)
- (9) GEY, G.O.  
GEY, M.K.  
INUI, F.  
and VEDDER, H. : Effects of crude and purified  
penicillin of continuous cul-  
tures of normal and malignant  
cells. Johns Hopkins Hosp.Bull.  
77,116-131 (1945)
- (9a) Penicillin action on strains of  
normal and cancer cells. Am.Ass.  
Adv.Sci.Sec.Chem.Res.Conf.Cancer  
Gibson Isl.Md.1944,p.321-328  
(1945)
- (10) PAUL, J. : Cell and Tissue Culture.Sec.Ed.  
E.& S.Livingstone Ltd.,Edin-  
burgh and London, 1960
- (11) HU, F.  
LIVINGOOD, C.S.  
JOHNSON, P.  
and POMERAT, C.M.J. : Tissue culture studies on human  
skin.IV.The comparative toxic  
effects of antibiotics on tis-  
sue culture explants of human  
skin and embryonic chick spleen.  
J.invest.Derm.20,357-372 (1953)



- (20) GOOSSENS, R. : Substitution de la pénicilline au jus embryonnaire dans les milieux comme facteur de Croissance des tissus en culture. C.r.Soc.Biol.(Paris) 148,981 - 986 (1954)
- (21) PLANELJES, J. und CHARITONOWA, A. : Wirkung der Antibiotika auf die subzellulären Strukturen der Parenchymorgane und des Hypothalamus. Moderne Medizin, Forschung und Klinik in der Sowjetunion. Bd.1, 15-22, (1971)
- (22) METZGER, J.F. Antibiotics in tissue culture. Exp.Cell Res.6,337-344 (1954)  
FUSILLO, M.H.  
CORNMAN, I.  
and KUHN, D.M. :
- (22a) METZGER, J.F. The effects of antibiotics in tissue culture.  
FUSILLO, M.H.  
and KUHN, D.M. : Anat.Rec.112, 360 + (1952)
- (23) BRUNNER, R. Die Antibiotika.  
und MASCHKE, G. : Hans Carl-Verlag, Nürnberg, 1962
- (24) VALENZUELA, A.M. : Accion de los antibioticos sobre cultivos de tejidos. Ann.Inst.Farmacol.Espan.2, 383-391 (1953)
- (25) WORK, T.S. : The selective toxicity of antibiotics. J.Appl.Bact.17,136 - 141 (1954)

- (26) LORIAM, V. : The mode of action of antibiotics on gram-negative bacilli. Arch.Intern.Med.128,623-632 (1971)
- (27) AMBROSE, E.J. : Studies on antibody production.  
and COONS, A.H. : VIII. J.exp.Med.117,1075 (1963)
- (28) ASTALDI, G. : I veleni della mitosi. I fattori che influiscono sull'attività  
MAURI, C. : ta riproduttiva delle cellule  
and ALLEGRI, A. : con particolare riguardo ai  
reperiti attenuti su culture in vitro.Farmaco sci.tec.2,405-451,  
530-573 (1947)
- (29) BUCHER, O. : Die Wirkung von Penicillin auf  
Gewebekulturen. I.Die Beeinflussung der Zellteilung durch  
Penicillin " Roche". Schweiz.med.Wschr.76,290-295 (1946)
- (29a) II.Weitere Mitteilungen über  
die Wirkung von Penicillin  
" Roche "; vergleichende Untersuchungen mit Penicillin "Ciba".  
Schweiz.med.Wschr.76,375-378  
(1946)
- (29b) Die Analyse des Teilungsgeschehens in der Gewebekultur in  
vitro als Test für die zytotoxische Wirkung verschiedener Penicillinpräparate. Schweiz.med.  
Wschr.77,930 + (1947)
- (29c) Die Wirkung von Penicillin auf  
Gewebekulturen. Schweiz.med.  
Wschr.77,849-852 (1947)



- (29d) BUCHER, O. Die Wirkung von Penicillin auf  
und BÖHM, C. : Meerschweinchen-Gewebekulturen  
in vitro, zugleich ein Beitrag  
zur Technik der Züchtung von  
Meerschweinchengewebe. Schweiz.  
Zschr.Path.Bakt.12,72-80 (1949)
- (30) GEY, G.O. Effects of crude and purified  
GEY, M.K. Penicillin on continuous cul-  
INUI, F. tures of normal and malignant  
and VEDDER, H. : cells. Johns Hopkins Hosp.Bull.  
77,116-131 (1945)
- (31) GROSSFELD, G.S. : Method for determination of  
the toxicity of antibiotics  
in tissue culture. Bull.biol.  
med.URSS 22,16-20 (1946)
- (32) HERRELL, W.E. Tissue culture studies on cyto-  
and HEILMAN, D.H. : toxicity of bactericidal agents.  
III. Cytotoxic and antibacteri-  
al activity of gramicidin and  
penicillin : comparison with  
other germicides. Am.J.Med.Sci.  
206,221-226 (1943) and Biol.  
Abstr.18,No.6850 (1944)
- (33) LEE, S.W. Effect of temperature on the  
and FOLEY, E.J. : action of penicillin in vitro.  
Proc.Soc.exp.Biol.Med.60,133-  
136 (1945)
- (34) LEONARDI, G. Azione inattivante del midollo  
and SCANU, A. : osseo coltivato in vitro nei  
confronti della penicillina.  
Acta med.ital.(Naples) 2,253  
- 255 (1947)
- (35) POMERAT, C.M. : Studies on Penicillium notatum  
in tissue cultures. Tex.Ac.Sci.  
Proc.Trans.28,130-132 (1945)

- (36) ROSE, H. M. Effect of penicillin on bactericidal contamination of eggs  
MOLLOY, E. and O'NEILL, E. : and tissue cultures inoculated with unfiltered sputums.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 23-25 (1945)
- (37) OISHI, Y. : Effects of antibiotics and chemotherapeutics on the growth of fibroblasts from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture II.  
Jap. J. Exp. Med. 26, 161-171 (1956)
- (38) METZGER, J. F. The effects of antibiotics in tissue culture.  
FUSILLO, M. H. and KUHN, D. M. : Anat. Rec. 112, 360 + (1952)
- (39) UMBREIT, W. : Mechanisms of antibacterial action. Ann. Rev. Microbiol. 8, 167-180 (1954)
- (40) EAGLE, H. Development of increased bacterial resistance to antibiotics.  
FLEISCHMAN, R. and LEVY, M. : I. Continuous spectrums of resistance to Penicillin, Chloramphenicol and Streptomycin.  
J. Bact. 63, 623-638 (1952)
- (41) ZAK, A. F. Interaction of Benzylpenicillin with tissue culture cells.  
YACOBSON, L. M. and SHATROVA, V. M. : Antibiotika 17, 723-727 (1972)
- (42) BINKLEY, S. B. : Biochemistry of Antibiotics.  
Ann. Rev. Biochem. 24, 597-626 (1952)

- (43) SALLE, A.J.  
and AMESUR, B.R. : Evaluation of germicidal efficiencies of a group of antibiotics tested by tissue culture technic. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 93,67-69 (1956)
- (44) CHANG, T.W.  
and WEINSTEIN, L. : Toxic effects of various penicillins and cephalosporin derivatives on human amnion cell cultures. Proc.Soc.exp.Biol. Med.124,980-987 (1967)
- (45) ZAK, A.F.  
YACOBSON, L.M.  
and SHATROVA, V.M. : Interaction of benzylpenicillin with tissue culture cells. Antibiotiki 17,723-727 (1972)
- (46) GOOSSENS, R. : Substitution de la pénicilline au jus embryonnaire dans les milieux comme facteur de croissance des tissus en culture. C.r.Soc.Biol.(Paris) 148,981-986 (1954)
- (47) MOLITOR, H.  
and O.E.GRAESSLE, : Pharmacology and toxicology of antibiotics. J.Pharmac.Exp. Therap. 98/II,1-60 (1950)
- (48) WORK, T.S. : The selective toxicity of antibiotics. J.Appl.Bact.17,136-141 (1954)
- (49) BALDWIN, D.S.  
LEVINE, B.B.  
McCLUSKEY, R.T.  
and GALLO, G.R. : Renal failure and interstitial nephritis due to penicillin and methicillin. New Engl.J. Med.279,1252-1255 (1968)
- (50) SOLE, A. : Über den Einfluß des Penicillins auf die Zelle. Wien.klin.Wschr. 1950,292-295

- (51) RADEMAKER, G.G.J. : On the toxic effects of penicillin on the nervous system. Fol. Psychiatr., Neerl. 53, 392 - 393 (1950)
- (52) MIESCHER, G. : Zur Toxikologie des Penicillins.  
und BLHM, C. Schweiz. Med. Wschr. 1947, 821-826
- (53) BUCHER, O. : Die Wirkung von Penicillin auf  
und BÖHM, C. Meerschweinchen-Gewebekulturen  
in vitro. Zugleich ein Beitrag zur Technik der Züchtung von Meerschweinchengewebe. Schweiz. Z. Path. Bakt. 12, 72-80 (1949)
- (54) BUCHER, O. : Die Wirkung von Penicillin auf Gewebekulturen. III. Untersuchungen mit Penicillin " Lilly ". Vergleich der Zytotoxizität verschiedener Penicillinpräparate. Schweiz. med. Wschr. 77, 171 - 173 (1947)
- (55) HU, F.N. : Tissue culture studies on  
LIVINGOOD, C.S. human skin. The comparative  
JOHNSON, P. toxic effects of antibiotics  
and POMERAT, Ch.M. : on tissue culture explants of human skin and embryonic chick spleen. J. invest. Derm. 20, 357 - 372 (1953)

## Die Aminoglykosid-Antibiotika

### 1a) Dihydrostreptomycin-Sulfat

Embryonale Explantate, Koronargefäße, Os frontale und Haut vom 12 Tage alten Hühnerembryo wurden mit Konzentrationen von  $4\text{ }\mu\text{g}$  bis  $0,0004\text{ }\mu\text{g/ml}$  Koagulum angesetzt und mikroskopisch auf ihre zytomorphologischen Reaktionen beobachtet. Dabei zeigte sich, daß die Endkonzentrationen von  $0,0004\text{ }\mu\text{g}$  eine starke, stimulierte Zellproliferation von Fibroblasten, Osteoblasten und Epithelzellen hervorruft und daß sämtliche Konzentrationen unter diesem Wert auch zu einer Stimulation der Mitose führen müssen. Ähnliche Resultate konnten auch bei einer Konzentration von  $0,002\text{ }\mu\text{g}$  erzielt werden.

### b) Streptomycin-Sulfat

Gewebe-Explantate (12 Tage) wie Koronargefäße, Os frontale und Haut wurden i.e.g.e. explantiert, angesetzt und kultiviert. Nach der Zugabe 1 gtt der Konzentrationen von  $4\text{ }\mu\text{g}$  bis  $0,002\text{ }\mu\text{g}$  konnten Zellbilder von einer totalen Inhibition bis zu einer ungehemmten Zellproliferation eruiert werden.

Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen ist nicht sehr bedeutend, bei  $0,2\text{ }\mu\text{g}$  STREPTOMYCIN-Sulfat scheint die eine Grenzkonzentration erreicht, während bei DIHYDRO-STREPTOMYCIN-Sulfat diese Grenze schon bei  $0,04\text{ }\mu\text{g}$  erreicht wird.

Bei unseren Untersuchungen - nicht nur mit der Deckglas-methode sondern auch mit der Roller-tube-Methode - wurde der Einfluß von STRM auf Hühnerherzfibroblasten untersucht. Das kultivierte Herzgewebe stammte von 9 Tage alten Hühnerherzen, und die Ausdehnung der Wachstumszone wurde alle 24 Stunden ausgemessen.

Der Zusatz von 90 000  $\mu\text{g}$  STRM/ml Nährmedium erzielt eine völlige Wachstumshemmung, bei 6 000  $\mu\text{g}$  bis 15 000  $\mu\text{g}$ /ml wurde eine teilweise Wachstumshemmung erreicht, wie es auch der Untersucher erzielte. (1) 5 mg STRM/ml Nährmedium stellt eine absolut lethale Dosis dar. (2 und 3) Es ist bekannt, daß STREPTOMYCIN (STRM) die Ribosomen bei Bakterien beeinflusst und so die Protein-Synthese blockiert. Das ist wieder der Grund dafür, daß die Bakterienzellen sterben. STRM verhindert die Einleitung der Protein-Synthese, indem sie veränderte Initiations-Komplexe einbringt. Unter Standard-Kultur-Bedingungen ist der antimikrobielle STRM-Effekt von der Konzentration und der Länge der Anwendungszeit beim Bakterium abhängig, aber auch bei der embryonalen Zelle dürften ähnliche Abläufe das aktive Eingreifen des STRM stimulieren. STRM könnte nicht nur an die Ribosomen der Bakterien gebunden werden, sondern wir nehmen an, daß eine ähnliche Verbindung auch an den Ribosomen der Zellen der embryonalen Gewebe erfolgt. Durch diese Blockade wird auch die für die embryonale Zelle notwendige Mitose inhibiert, die Zellen stellen ihr Wachstum ein und gehen ein. STRM wirkt nur dann bakterizid, wenn im getroffenen Mikroorganismus und auch bei embryonalen Zellen eine Proteinsynthese abläuft. Die DNA- und RNA-Synthese selbst wird durch STRM nicht gehemmt. Aber als Folge der Blockade der Proteinsynthese dürfte ein indirekter Effekt auch die Nukleinsäuren beeinträchtigen. (4) Viele der toxischen Effekte sind dosisabhängig, sie sind ein Resultat von Drogenqualität und der Behandlungsdauer. Viele, nicht alle, der unerwarteten Effekte sind reversibel, aber besonders an der embryonalen Zelle treten viele irreversible Effekte an den Explantaten ein. Die ungefährlichste Dosis wird mit 50  $\mu\text{g}$ /ml angegeben. (5) Studien der Physiologie von Mutanten, von Prozessen der Drogenwirkung in vivo und den Effekten an Geweben in Kultur, alle sind notwendig, um einen Einblick in den Mechanismus des zytotoxischen Ablaufes zu gewähren. Ribosomen-

funktion, oft als "ribosome cycle" oder "polyribosome metabolism" bezeichnet, gibt eine Erklärung über diesen Weg der Wirkung von Antibiotika. (6)

Ein Antibiotikum, gebunden an ein Ribosom, ermöglicht eine potentielle Einwirkung auf die Proteinsynthese, kann aber auch zu einer Aberration am Ribosom führen. Im Falle des STRM tritt eine anfängliche Blockade der Proteinsynthese ein, es folgt ein Polyribosomen-Verlust und die Ansammlung von 70 S Ribosomen. In vivo geht der Zusammenbruch mit einem Zurückbleiben von Proteinbestandteilen einher. STRM, ein Aminoglycosid-Antibiotikum, ist eine hochpolare organische Base mit einer großen Anzahl von hydrophilen und funktionellen Gruppen. Der primäre Effekt ist die feste Bindung an das Protein. Sekundär inhibiert es eine Anzahl von vitalen Funktionen, Zerstörung der Zellwand, Inhibition der RNS, der DNS-Synthese und der Respiration. (7)

Nach neueren Untersuchungen reagiert das STRM mit dem die Proteinsynthese auslösenden Initiator-Protein, somit wird die Synthese inhibiert. Diese Hypothese der Proteinsynthese-Blockade hätte den Vorteil, hiermit auch die bakterizide Wirkung des Antibiotikums zu erklären. (8)

Inhibition ist nicht die einzige Antwort auf den STRM-Gebrauch, angemessene Dosen - wie in den hier vorgelegten Untersuchungen - vermögen das Fibroblastenwachstum zu stimulieren. (7)

Otocyten vom embryonalen Huhn wurden in der "Rose chamber" mit hohen Dosen von 6 mg/ml perfundiert. Die Autoren berichten von einer Aufblähung des Neuronen-Zytoplasmas, Chromatolyse und einem Rückgang der Neurofibrillen. (9)

Keimabtötung mittels Antibiotika findet seit längerer Zeit eine steigende Anwendung, besonders bei der Kultur von kontaminierten Tumorgeweben und bei der Gewebesterilisierung von Gewebsfragmenten des Menschen. Für gewöhnlich genügt es, der Waschlösung und dem Nährmedium 50 - 100 i.E. PENICILLIN und 100 - 500 µg STRM/ml zuzufügen. (10)



Über die Wirkungsweise des STRM, hier besonders auf Gewebe- und Zellkulturen, liegen viele Daten vor, einige sollen hier angeführt werden, aber es fehlt eine einheitliche Interpretation, die die Zusammenhänge klären könnte. (11)

STRM wird sowohl in der Wachstumsphase der Bakterien als auch der sich vermehrenden, mitotischen Zelle, aufgenommen. Die Proteinsynthese wird unterbrochen. Eine weitere STRM-Aufnahme beeinflusst die Bakterien-Atmung, RNS- und DNS-Synthese werden inhibiert und Nucleotide ausgeschieden. (12)

Wegen seiner hohen Toxizität auf embryonale und adulte Gewebe wird STRM im Gegensatz zu PENICILLIN in einer viel geringeren Dosis verabfolgt, höchstens 50 µg/ml. Dihydrostreptomycin-Sulfat initiiert bereits mit 1 000 µg/ml eine tiefe Zelldepression. (13)

STRM rief in einer Konzentration von 250 µg/ml am embryonalen Hühnerherz und der Aorta eine beginnende und mit 25 000 µg/ml eine vollständige Inhibition hervor. (14)

Os frontale und embryonaler Kardialmuskel zeigten eine Inhibition des zellulären Geschehens bei 1 000 µg/ml und eine profunde Nekrose bei 100 000 µg/ml Nährmedium. (15) Haut des Menschen stellt die Zellproliferation bei 1 000 µg/ml ein und erfährt eine profunde Inhibition bei 10 000 µg/ml. (16)

Kardialmuskel-Explantate des embryonalen Hühnchens lassen die erste Zellhemmung bereits nach 60 µg/ml auftreten und die vollständige Inhibition nach 90 000 µg/ml. (17) Nervöses Gewebe reagierte mit STRM in einer Art und Weise, die typisch für nervöses Gewebe in Kultur zu sein scheint. (18)

Die organotropen Wirkungen des STRM auf die Gewebekultur wurden schon bald nach der Aufnahme des STRM in die Humantherapie begonnen. (19) Die Wirkung des STRM reicht von der Stimulation bei kleinen Dosen, über eine inhibierte Depression bis zur vollständigen Inhibition bei hohen Dosen. (20)

Pulmonäres Gewebe wurde mit STRM konfrontiert und zeigte die für das Antibiotikum schon bekannten typischen Reaktionen, von der Inhibition bis zur Stimulation. (21)

Die zytotoxischen Aktivitäten des STRM und seine metabolischen Folgen in der Gewebekultur beschäftigte viele Untersucher. (22)

Viele Autoren befaßten sich mit der Wirkung des STRM auf embryonale Gewebeexplantate. Säugetierzellen von resistenten und sensitiven Stämmen erhielten pro Kultur  $2 \times 10^5$  Zellen. Zu dem Medium wurden folgende Mengen des Antibiotikums hinzugefügt: 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2,5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg und 7 mg STRM/ml. Der minimale letale Punkt war verschieden, da die Resistenz der einzelnen Zellstämme sehr unterschiedlich war. Es gab Zellen, die schon bei 0,5 mg/ml ihre Vermehrung einstellten und bei 2,5 mg/ml ad exitum kamen. (23)

Um das Interesse an der Einwirkung der Antibiotika auf normale Zellen und um den Gebrauch von Antibiotika für die Sterilisierung von Geweben genau festzustellen, untersuchten mehrere Autoren, um auch die Ergebnisse von anderen Untersuchern zu bestätigen, den Effekt, den STRM hinterläßt, wenn es auf Kardialmuskel vom 9 Tage alten Hühnerembryo einwirkt: Bei 90 000 µg/ml wird das Wachstum inhibiert. (24)

Das embryonale Hühnerherz und die aus diesen Kulturen herauswachsenden Fibroblasten sind sowohl für unsere Untersuchungen als auch für viele Toxizitäts-Versuche das Mittel der Wahl. Eine sterile Entnahme der Gewebe und die sterile Verarbeitung zur Kultur sind allerdings Voraussetzungen für die hier vorgelegten Untersuchungen.

In der einfachen Kultur im hängenden Tropfen, in der CARREL-Schale oder vermittels der "roller tube"-Kulturmethode läßt sich die Wirkung des STRM darstellen. (25) Diese Testmethoden erbrachten auch für die pepsinische Proteolyse durch das STRM Resultate. (26)

Jede Kultur besteht aus zwei Teilen unterschiedlicher Konfiguration, aus dem Explantat-Mutterstück und der Wachs-

tumszone. Die Zellen und Strukturen der Wachstumszone sind die Objekte unserer Untersuchungen. Bei dem Wachstum in Kultur sind zwei hauptsächliche Vorgänge zu unterscheiden: Zellmigration und Zellproliferation. Das dreidimensionale Netzwerk des Bindegewebes vom embryonalen Herzmuskel ist die für Testmethoden übliche Wachstumsform. Die Kultur als Ganzes hat die Form einer flachen Scheibe, deren Dicke vom Zentrum nach der Peripherie abnimmt. Man kann eine Gewebekultur nicht mit einer Bakterienkolonie vergleichen. Die Tendenz der Protoplasma-Kontinuität ist das Hauptprinzip der Histiogenese. Der Konnex durch protoplasmatische Zusammenhänge ist in gut gewachsenen Kulturen sichtbar.

Auch bei improvisierten Gewebekulturen bedarf es einer Absicherung gegen bakterielle Kontamination und dabei wird außer PENICILLIN auch oft STREPTOMYCIN 100 - 500  $\mu$ g/ml verwendet. Nur überschreitet man ungewollt die Grenzkonzentration von 100  $\mu$ g/1 ml, so bekommt man zytotoxische Erscheinungen an den Zellen der Wachstumszone. (27)

Wurden Säugetierzellen mit STRM in relativ hohen Dosen über 500  $\mu$ g konfrontiert, so ergab es toxische Reaktionen. Eine Aminosäure im Wachstumsmedium ist der entscheidende Faktor für die Reaktion der Säugetierzelle auf STRM.

Variationen im Aminosäure-Gehalt eines Nährmediums können die Permeabilität, die RNA-Synthese und andere Regulationsmechanismen der Zellen beeinflussen. Zugewetztes Cystein kann die Empfindlichkeit für STRM aber nicht für DHSTRM vergrößern.

STRM bedingt die "misreading" des genetischen Codes im in-vitro-System, und eine Zytotoxizität, in dem es die Produktion einer großen Zahl von abnormen oder nicht-funktionierenden Proteinen bedingt. Diese Hypothese setzt voraus, daß das abnorme Protein einen hohen Cysteingehalt hat. (28)

STREPTOMYCIN und DIHYDROSTREPTOMYCIN präzipitieren Nuklein-Säuren.

STRM ist ein wirksameres Mittel zur Präzipitation von Nukleinsäure als DIHYDRO-STRM. Diese Unterschiede in der Präzipitation von Nukleinsäuren indizieren, daß andere Merkmale des Moleküls auf diese Reaktion wirken. Die Beobachtung, daß STRM empfindliche Säugetierzellen zerstört, während DIHYDRO-STRM einen relativ geringeren Effekt hat, läßt die Vermutung naheliegen, daß es die Nukleinsäuren nicht so präzipitiert wie das STRM. Der Wirkungsunterschied bei unseren Kulturen läßt die Vermutung zu, daß STRM sofort nach der Dotation mit der Nukleinsäure sich zu einer festen Komponente verbindet. (29)

Die Differenzen im Verhalten zwischen beiden Komponenten mit den Nukleinsäuren kann brauchbar für die Erklärungen der biologischen Aktivität dieser Antibiotika genutzt werden. Bei der Verwendung beider Substanzen erscheint es möglich, die segmentielle Interferenz mit den Nukleinsäuren in der Zelle zu untersuchen. (30)

Zellen, resistent auf relativ große Mengen von Streptomycin, wurden aus einem Stamm von Streptomycin-sensitiven Säugetierzellen isoliert. Durch die Klon-Technik wurden sowohl resistente als auch sensitive Stämme in Abwesenheit von Streptomycin kultiviert. (31)

Streptomycin wird durch die ribosomale Untereinheit (30 S) gebunden, verändert deren Struktur und hemmt dadurch die Proteinsynthese, wobei gleichzeitig Code-Fehlablesungen stattfinden, die auf die verzernte Ribosomenstruktur zurückzuführen sind. (32)

Unter Anwendung der Roller-tube-Methode wurde der Einfluß von Chloromycetin und Streptomycin auf das Wachstum von Hühnerherzfibroblasten untersucht. Das kultivierte Hühnergewebe stammte von 9 Tage alten Hühnerembryonen. Die Ausdehnung der Wachstumszone wurde nach 48 Stunden Bebrütung bei 37°C gemessen. Die Antibiotika wurden in verschiedenen Verdünnungen der Tyrode-Lösung zugesetzt, die ein Bestandteil des Nährmediums bildete. Bei Zusatz von 90 000 µg STRM/ml und mehr wurde eine völlige Inhibition jeglicher Proliferation, bei 6 000 - 15 000 µg STRM eine teilweise Wachstumshemmung erzielt. (33)

Die Beeinflussung der Proteinsynthese durch Aminoglykosid-Antibiotika wie Streptomycin und Dihydrostreptomycin, aber auch Kanamycin und Neomycin wurden untersucht. Alle vom Streptomycin bekannten Effekte, wie Schädigung der Zytoplasmamembran, Veränderungen der Zellwand, Beeinflussung der oxydativen Phosphorylierung sind möglicherweise Sekundäreffekte als Folge einer Hemmung der Proteinsynthese und einer Änderung der Permeabilitätsschranke. (34) Um den Einfluß der Antibiotika auf die Mitose zu studieren, wurden Fragmente von Hühnerembryonen, die mit Streptomycin behandelt waren, nach Feulgen gefärbt. Streptomycin halbiert den Mitoseindex und die Zahl der Prophasen. Es vermindert die Anaphasen und Telophasen, aber vergrößert die Zahl der Metaphasen. In der Prophase greift die Substanz in das mitotische Geschehen ein. (34 und 35)

Die Empfindlichkeit von kultivierten Säugetierzellen gegenüber STRM und DIHYDRO-STRM ist nach obigen Untersuchungen sehr unterschiedlich. (36)

Die Nukleinsäuren, DNS und RNS, Peptone, Nukleoproteine, Seren, Albumine, sowie andere zelluläre Bestandteile können mit dem STRM unlösliche Komplexe bilden. Bestünde nicht auch die Möglichkeit, daß ähnlich wie bei dem Mikroorganismus *Nitella clavata* die primäre Aktionsphase in einer Befestigung des STRM und einer Einflußnahme auf der Oberfläche der kultivierten Zellen beginnt. (37)

Zur Pharmakologie und über die Nebenwirkungen des STRM auf Zellen und Gewebe des Menschen gibt es noch mannigfaltige Aussagen. STRM und auch andere Aminoglykosid-Antibiotika agieren im Bakterium direkt am Ribosom, wo sie die Proteinbiosynthese unterbrechen und die Genauigkeit der Translation des genetischen Codes vermindern. (35) Daneben gibt es noch Sekundäreffekte auf eine Vielzahl von Zellfunktionen, inklusive der Respiration, Enzymadaptation, Membranintegrität und die Stabilität der RNS. (36) STRM inhibiert die enzymatische Polymerisation der Aminosäuren. Alle diese Aktivitäten, die das STRM am Bakterium



ausübt, sollten auch für die kultivierte Zelle mindestens zu einem Teil zutreffen. (37)

Auf Grund der hier angeführten Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen und den Gegenüberstellungen mit den Ergebnissen anderer Autoren kommen wir zu der Aussage, daß STREPTOMYCIN für die kultivierten Zellen und auch das Gewebe außerordentlich zytotoxisch ist. -

Es gibt keinen Beweis, daß das Streptomycin im Körper zerstört oder inaktiviert wird; es wird in gewissen Körpergeweben, z.B. in der Niere, akkumuliert.

Wie anders bei den hier vorgelegten Untersuchungen an Geweben in der Kultur, dort muß eine Direktwirkung erfolgen und könnte eine Metabolisierung stattfinden, wie wären sonst die zahlreichen zellulären Effekte zu erklären?

(38)

Haut vom Menschen und "Chicken-spleen" wurden in der Gewebekultur zum Vergleich ihrer Toxizität nebeneinander kultiviert.

Diese Explantate, Hautepithel vom Menschen und Milzexplantate vom Hühnchen, wurden in ein Plasma-Extrakt-Koagulum eingebettet, das aber unglücklicherweise 1 000 µg/ml Penicillin enthielt. Dadurch könnten zelluläre Aberrationen erzielt werden, die die eigentliche Reaktion verschleiern. Wenn sich der Klotz gefestigt hat, wird noch Ascites-Fluid dazu gegeben. Diese Kultur "im hängenden Tropfen" wird im Thermostat für 8 Tage inkubiert. Die Milz-Explantate stammten vom 18 Tage alten Hühnerembryo.

Streptomycin übt auf die Chicken-Milz einen ungewöhnlich zytotoxischen Einfluß aus. Die Humanhaut wird ähnlich wie die Milz durch Streptomycin geschädigt, aber die Konzentration muß etwas größer sein. (39)

Der Vorteil der Gewebekultur gegenüber dem Tierversuch in der Analyse der Wirkung von Streptomycin und Dihydrostreptomycin ist klar. Deshalb wurden hier nur Primokulturen mit den Testsubstanzen konfrontiert, weil viele Eigenschaften in folgenden Subkulturen verloren gehen könnten.

Literaturverzeichnis : Diskussion 1) STREPTOMYCIN

- (1) FUSILLO, M.H. Effect of chloromycetin and  
METZGER, J.F. streptomycin on embryonic  
KUHN, D.M. : tissue growth in in vitro  
tissue culture. Proc.Soc.exp.  
Biol.Med.79,376-377 (1952)
- (2) METZGER, D.P.jr. Studies on the effect of strepto-  
and MOSKOWITZ, M. : mycin on mammalian cells in  
culture.II. Effect on mixtures  
of sensitive and resistant  
strains. Exp.Cell Res.30,388-  
-392 (1963)
- (3) METZGER jr, D.P. I.Isolation of resistant strains.  
and MOSKOWITZ, M. : Exp.Cell Res.30,379-387 (1963)
- (4) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharmako-  
logischer Wirkungen. F.K.Schat-  
tauer Verlag Stuttgart, 1971
- (5) MOSCONA, A. Methods.  
TROWELL, O.A. in " Cells and Tissues in Cultu-  
WILLMER, E.N. : re " by E.N.WILLMER, vol.I, Chapt.  
2, Academic Press, 1965, London,  
New York.
- (6) SCHLESSINGER, D. Effects of some antibiotics and  
PHILIPPS, S.L. mutational lesions of polyribo-  
CRAIG, E. : some metabolism. In MUNOZ, E.,  
GARCIA-FERRANDIZ, F. and VAS-  
QUEZ, D. : Molecular mechanism  
of antibiotic action on protein  
biosynthesis and membranes.  
Proc.Symp.Granada, June 1971,  
p.75-90 (1971)



- (7) ARANDA, R.S. Effects of antibiotics on tissue  
FERNANDEZ, E.M. cultures. Penicillin and Dihydro-  
and FUERTES, A.M. : streptomycin. Arch.Inst.farmacol.  
exp.(Madrid) 9,143-157 (1957)
- (8) SCHRINNER, E. : Zum Wirkungsmechanismus der  
Antibiotika. Dtsch.med.J.22,647  
-652 (1971)
- (9) ORR, M.F. The effect of streptomycin upon  
and SHAMBAUGH, G.E. : ganglion cells in Rose chamber  
culture of chick otocyst.  
Excerpta Med.16,Sect.I.No.9,  
Tissue Culture, Ass.XIII.Annual  
Meeting, Washington.
- (10) RERABEK, J. Leitfaden der Gewebezüchtung.  
und RERABEK, E. : VEB Gustav Fischer Verlag, Jena  
1960
- (11) JACOEY, G.A. Antibiotics I. Springer Verlag  
and GORINI, L. : Berlin, Heidelberg, New York, 1967
- (12) DUBIN, D.T. The sequence of effects of strep-  
HANCOCK, R. tomycin in Escherichia coli.  
and DAVIES, B.D. : Biochim.Biophys.Acta 74,476-489  
(1963)
- (13) OISHI, Y.Y. : The effects of antibiotics and  
chemotherapeutic agents on the  
growth of fibroblasts from  
chick embryo heart in the simpli-  
fied replicate tissue culture.  
Jap.J.exp.Med.24,167-179 (1954)
- (14) RODOVA, H.K. : The effect of streptomycin on  
tissue cultures. Experientia 4,  
483-484 (1948)

- (15) IKEGAKI, K. : Effects of streptomycin on the growth of normal tissue cells in vitro. Antibiotics 4, 311-313 (1951)
- (16) CRUICKSHANK, C. N. D. Effect of antibiotics on tissue and LOWBURY, E. J. L. : cultures of human skin. Brit. med. J. 2, 1070-1072 (1952)
- (17) METZGER, J. F. Antibiotics in tissue culture. FUSILLO, M. H. Exp. Cell Res. 6, 337-344 (1954) CORNMANN, I. and KUHN, D. M. :
- (18) BARSKI, G. Action de la streptomycine sur and MAURIN, J. : le tissu nerveux en culture. Ann. Inst. Pasteur. 76, 295-302 (1949)
- (19) CARVALHO, S. de : Accao da estreptomycine sobre cultura de tecidos. Nota previa. Gaz. med. portug. 2, 639-645 (1949) Farmacol. terap. 1, 77-83 (1949)
- (20) HEILMAN, D. H. : Cytotoxicity of streptomycin and streptothricin. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 365-367 (1945)
- (21) PIRES SOARES, J. M. Comportement des cultures " in VIDAL, C. vitro " de tissu pulmonaire en DeCAVALHO, A. : présence de la streptomycine. Arch. portug. sci. biol. Suppl. 10, 48-49 (1949); Che, Abstr. 44, 9499 (1950)
- (22) RODOVA, H. K. : The effect of streptomycin on tissue cultures. Experientia 4, 483- 484 (1948)

- (23) METZGAR jr,D.P. : Studies of the effect of strepto-  
and MOSKOWITZ,M. : mycin on mammalian cells in  
culture.I. Isolation of resis -  
tant strains. Exp.Cell Res.30,  
379-387 (1963)
- (24) FUSILLIO,M.H. : Effect of chloromycetin and  
METZGER,J.F. : streptomycin on embryonic tis-  
and KUHNIS,D.M. : sue growth in in vitro tissue  
culture.Proc.Soc.exp.Biol.Med.79,  
376-377 (1952)
- (25) OISHI,Y.Y. : II. Effects of antibiotics and  
chemotherapeutics on the growth  
of fibroblasts from chick embryo  
heart. Jap.J.exp.Med.26,161-171  
(1956)
- (26) CASTAGNETTA,G.C. : Influenza degli antibiotici sulla  
and CASTAGNETTA,E. : proteolisi pepsinica in vitro.II.  
Risultati attenuati con la strepto-  
-micina. Aggiorn.Mal.Infect.3,  
293-296 (1957)
- (27) SMITH,C.G. : An improved tissue culture assay.  
LUMMIS,W.L. : II. Cytotoxicity studies with  
and GRADY,J.E. : antibiotics,chemicals and solvent  
Cancer Res.19,847-852 (1959)
- (28) MOSKOWITZ,M. : Amino acid control of strepto-  
and KELKER,N.E. : mycin action of mammalian cells.  
Nature 205,476-477 (1965)
- (29) MOSKOWITZ,M. : Differences in precipitability  
of nucleic acids with strepto-  
mycin and dihydrostreptomycin.  
Nature 200,335-337 (1963)

- (30) MÜCKTER, H. : Zur Pharmakologie der basischen Streptomycines-Antibiotika. Antibiotics Chemother. 9, 83-144 (1961)
- (31) METZGAR, jr. D. P. and MOSKOWITZ, M. : Studies on the effect of streptomycin on mammalian cells in culture. I. Isolation of resistant strains. Exp. Cell Res. 30, 379-387 (1963)
- (32) HARTMANN, G. Antibiotica als Hemmstoffe der BEHR, W. Nucleinsäure- und Proteinsynthese. Angew. Chem. 80, 710-718 BEISSNER, K.-A. (1968) HONIKEL, K. und SIPPEL, A. :
- (33) FUSILLO, M. H. Effect of chloromycetin and METZGER, J. F. streptomycin on embryonic tissue and KUHNS, D. M. : growth in in vitro tissue culture. Proc. Sov. exp. Biol. Med. 79, 376-377 (1952)
- (34) DELLWEG, H. : Neuere Aspekte zur Wirkungsweise einiger Antibiotika. Dtsch. med. Wschr. 91, 16-97-1701 (1966)
- (35) SCHINDEL, L. : Nebenwirkungen von Streptomycin und Dihydrostreptomycin. Antibiotica et Chemotherapia 5, 201-299 (1958)
- (36) MOSONY, L. : Die Wirkung der Antibiotika auf die Zellen. Antibiotica et Chemotherapia 5, 230-299 (1958)
- (36a) MOSKOWITZ, M. Sensitivity of cultured mammalian and KELKER, N. E. : cells to streptomycin and dihydrostreptomycin. Science 141, 647-648 (1963)

- (37) YOURASSOWSKY, E. : Cinétique de l'action des antibiotiques en milieu plasmatique. Acta Clin. Belgica, Suppl. 4 (1967)  
Mode of action of streptomycin. Bact. Rev. 17, 37-41 (1953)
- (38) MOLITOR, H. Pharmacology and toxicology of  
and GRAESSLE, O. E. : antibiotics. J. Pharmac. Exp. Therap 98/II, 1-60 (1950)
- (39) LIVINGOOD, C. S. Tissue culture of human skin  
and HU, F. N. : and chicken spleen as a method for evaluating the primary irritant producing capacity of topical medicaments. Correlation of results with clinical observations. Ann. N. Y. Acad. Sci. 58, 1202 - 1209 (1954)



## KANAMYCIN

KANAMYCIN (KM) ist eine polybasische, wasserlösliche Substanz, die NEOMYCIN nahe steht und als Aminoglykosid-Antibiotikum mit dem STRM verwandt ist. Die Substanz ist bei pH 2 bis 11 stabil.

KM hat ein breites Spektrum gegen gram-positive und gram-negative Mikroorganismen. Staphylococcen werden schon bei  $1\mu\text{g/ml}$  oder weniger unterdrückt. (1)

In unseren Untersuchungen gingen wir davon aus, daß eine Hochdosierung an den Gewebekulturen eine Inhibitions-Wirkung zeigen müßte, die auch dann erwartungsgemäß auftrat. Eine unerwartete Reaktion nach KM-Dotation trat auf: Das Plasma-Extrakt-Koagulum besteht aus Fibrin und Thrombin, es koagulierte nicht. Mit Zunahme der Verdünnung der Substanz läßt dieser Effekt nach.

Wurden Gewebekulturen des embryonalen Kardialmuskels und der Koronargefäße (16 Tg) mit Konzentrationsstufen zwischen  $4\mu\text{g}$  und  $0,04\mu\text{g}$  mit diesem Antibiotikum konfrontiert, so ergaben sich nur Inhibitionen. Noch bei  $0,04\mu\text{g}$  zeigt sich eine partielle Inhibition bzw. eine Hemmung, die sich in der Proliferation verbildeter Zellkörper äußerte. Erst bei einer Konzentration von  $0,0002\text{ mg/l}$  gtt wurde ein Stimulations-Effekt erzielt. Bei einer Konzentration von  $1\text{ g KANAMYTREX} : 100\text{ ml Lösungsmittel}$  trat neben einer vollständigen Inhibition der Zellproliferation, einer Antikoagulationswirkung, auch noch eine Zerstörung der Federkapillen ein.

Zur Gewebekultur werden nur höchstens  $100\mu\text{g/ml}$  empfohlen. (2)

Im Vordergrund der Nebenwirkungen des KM stehen Schädigungen des Akustikus und Störungen der Nierenfunktion, die man auch an Nierenkulturen zeigen kann, die Proliferation der Nierenepithelien ist außerordentlich stark eingeschränkt.

Auch die Eosinophilen des Blutes reagieren sehr empfindlich auf KM, ihre Anzahl im Blut steigt an. (3)



Ototoxische Antibiotika erzeugen an der Feinstruktur der isolierten Ohr-Anlage vom embryonalen Huhn extensive morphologische Veränderungen, besonders im Hinblick auf die Mitochondrien, das endoplasmatische Reticulum des Sinnesareals und auf die Nervengewebe. Kleine Dosen dieser Antibiotika rufen eine Vakuolisierung der Mitochondrien hervor.

Die ototoxischen Antibiotika scheinen auch im Golgiapparat sehr aktiv zu sein, denn sie führen zu einer extensiven Degeneration der Mitochondrien in der Zwischenzone, so daß die Funktion des Sensor-Apparates zerstört wird. (4)

KM beeinflusst die Cochlea, den spiraligen Kanal im Ohr-Labyrinth des Meerschweinchens, ebenfalls so, daß es seine Funktion einstellt. (5)

Neben der Ototoxizität ist aber auch die Nephrotoxizität an den Geweben *in vitro* gut feststellbar.

Daneben manifestiert sich durch KM auch noch eine Neurotoxizität. Ein Curare-ähnlicher Effekt auf neuro-muskuläre Verbindungen ist auffällig. Wenn das Antibiotikum in das Peritoneum injiziert wird, so kann eine Paralyse der Respiration eintreten. Prothrombin und Plasmafibrinogen können durch KM zu Beginn einer Behandlung vermindert werden.

Der ototoxische Effekt durch KM kann zu einer graduellen Taubheit bei Individuen führen, die KM parenteral eingenommen haben. (6)

Nicht nur Nierengewebe werden toxisch geschädigt, sondern auch andere Explantate, wie wir es in den vorliegenden Untersuchungen feststellen konnten.

Das Antibiotikum KANAMYCIN wirkt nicht nur auf Bakterien, sondern - wie aus den vorliegenden Untersuchungen hervorgeht - auch auf embryonale Zellen und Gewebe; es hat damit auch eine Bedeutung für die Embryonalpharmakologie. - Eine Wirkung des Kanamycins durch Eingreifen in den oxidativen Zellstoffwechsel erscheint wahrscheinlich:

Aerobier sind weit empfindlicher als Anaerobier; Komponenten des KREBS'schen Tricarboxylzyklus wirken antagonistisch. (7) Innerhalb der antibakteriellen Substanzen, die hemmend in die Proteinsynthese eingreifen, war keine Übereinstimmung der Wirkung auf reparative Granulationsgewebe festzustellen. Kanamycin beeinflusst im Gegensatz zu Neomycin, das die Granulationsgewebe stärker beeinträchtigt, fast gar nicht die Granulation. Auch Kanamycin kann ototoxisch sein. (8) Die Kanamycin-Wirkung wird wahrscheinlich durch einen Eingriff in den oxydativen Zellstoffwechsel für möglich gehalten.

Literaturverzeichnis : Diskussion 1) KANAMYCIN

- (1) WEINSTEIN, L. : Antibiotics.  
IV. Miscellaneous antimicrobial,  
antifungal and antiviral agents.  
Chapter 60, pp.1269-1310  
in L.S.GOODMAN and A.GILMAN :  
The pharmacological basis of  
therapeutics, Mac Millan Comp.  
London, 1970
- (2) KUNIN, C. : Absorption, distribution, excretion  
and fate of kanamycin. Ann.N.Y.  
Acad.Sci.132, 811-818 (1966).
- (3) SCHINDEL, L. : Unerwartete Arzneimittelwirkun-  
gen : Kanamycin , Med.Mschr.H.3,  
März 1964, 109-111
- (4) FRIEDMAN, I. The effect of ototoxic antibo-  
and BIRD, E.S. : dies and of penicillin on the  
sensory areas of the isolated  
fowl embryo otocyst in organ  
cultures. J.Path.Bact.81, 81  
(1961a)
- (5) FRIEDMAN, I. : The ear. Chapter 11, pp.521-547  
in WILLMER, E.N. " Cells and  
Tissues in Culture ", vol.2, (1965)
- (6) FROST, J.O. Kanamycin. II. Ototoxicity.  
HAWKINS, J.F. Ann.Rev, Resp.Dis.82, 23-30 (1960)  
and DALY, J.F. :
- (7) GOUREWITCH, A. Studies on the mechanism of ac-  
TYNDA, J.M. tion of kanamycin. Antibiotics  
PUGLISI, T.A. Annual 1958-59, N.Y.Med.Encyclop.  
and LEIN, J. : Inc. 1959, p.784 +
- (8) NEUNDÖRFER, B. : Medikamentös bedingte neurologi-  
sche und muskuläre Störungen.

GENTAMYCIN      Refobacin (R)

A. Gentamycin und embryonale Zellen und Gewebe

Das Gentamycin (GM) besteht aus einem Komplex von Antibiotika ähnlicher chemischer Konfiguration, die aus Kulturfiltraten von zwei zur Familie der Aktinomyzeten gehörenden Mikromonospora-Spezies, *M. purpurea* sp.n. und *M. echinospora* sp.n. gewonnen wird. (1a, b)

Es ist ein bakterizid wirkendes Aminoglykosid-Antibiotikum, das aus mehreren Isomeren, u.a. Gentamycin A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und D besteht. Die Isomeren C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> besitzen ähnliche antibakterielle und pharmakologische Eigenschaften. (2)

Das Aminoglykosid-Antibiotikum "GENTAMYCIN" wirkt nicht nur auf Parasiten, sondern, wie es in den vorliegenden Untersuchungen deutlich wird, auch auf embryonales tierisches Gewebe und in der Human-Therapie auf den Patienten.

Bindegewebs- und Epithel-Explantate vom 9 bis 12 Tage alten Hühnerembryo, u.a. Kardialmuskel-, Koronargefäß-, Os frontale-, Iris-, Leber-, Epidermis-, Darm-, Knochenmark- und Lungen-Explantate erhielten nach dem Umsetzen in der 1. Passage 1 gtt = 0,014 - 0,016 mg einer Konzentration von 1 mg GENTAMYCIN (GM) : 1 ml physiologischer Nährlösung.

Die Bindegewebsexplantate, das Knochengewebe, die Epithelgewebe und die Zellen des Knochenmarks zeigten unterschiedliche Reaktionen auf die dotierte Fremdschubstanz. Während die Fibroblastenkulturen teils eine gute Proliferation mit veränderter Zellmorphie aufwiesen oder die Situation einer mäßig gehemmten Zellproliferation mit starker Infiltration der Testlösung zeigten, trat auch bedingt durch den Zusatz des GM eine starke Proteolyse auf, die sowohl das Medium lysierte, als auch die Wachstumszone zerstörte. Nach 72 Stunden ist die anfängliche Inhibition überwunden, es erfolgt aus der Tiefe eine neue sekundäre Proliferation,

die nun nach Metabolisierung des Gentamycins, nicht mehr inhibiert werden kann. Diese sekundäre Proliferation weist dünne feinfaserige Fibroblasten auf.

Auch die sehr empfindlichen Knochengewebe des embryonalen Os frontale zeigen ein ähnliches Bild. Die Osteoblasten reagieren sehr empfindlich auf den Zusatz einer Fremdschubstanz. Ihre Zellproliferationspotenz ist wesentlich reduziert. Das Pigmentepithel der embryonalen Iris und die Epithelien von Leber, Epidermis, Darm und Lunge unterschieden sich kaum in ihrer Reaktion. 50 % der Kulturen weisen eine totale Inhibition, 50 % nur eine geringe Zellproliferation auf. Die allen Epithelien innewohnende proteolytische Aktivität zerstört das Medium und auch die Wachstumszone. Sie führt dort zur Absiedlung kleiner Zellkolonien. Epithelien sind im Gegensatz zum Bindegewebe sehr viel sensibler auf Zusätze zum Medium.

Die Rückenmarkskulturen bilden Neuroepithelmenbranen, in denen sich Nervenzellen differenzieren, die ihrerseits sehr empfindlich mit einer totalen Inhibition reagieren. Die Konzentration von 1 mg GM : 2 ml Lösungsmittel wurden den gleichen Bindegewebs-, Knochen- und Epithel-Explantaten dotiert. Hier reagieren die embryonalen Zellverbände sehr unterschiedlich auf die Konzentration.

Kardialmuskel- und Koronargefäß-Kulturen wiesen zu 25 % einen klaren Mitosestop auf, während 75 % ein inhibitionsartig verformtes Zellbild einer epitheloformen Proliferation aufwiesen. 72 Stunden nach Ansatz war das Zellbild sehr uneinheitlich, hier Inhibition und hier epithelzellähnliche Zellmorphie, Zellhäufchen anstelle der ursprünglich vorhandenen Wachstumszone. In Kulturen von lymphatischem Gewebe = Milz resultierte ein typisches Wachstum von Lymphozyten. Die Lymphozyten der Milz zeigten im Gegensatz zu den anderen exponierten Geweben und Zellen keine Inhibition. Auch die in der 3. Wachstumsphase aus dem Inneren der Milzexplantate emigrierten Zellen wurden durch das GM nicht in ihrer Proliferations-Aktivität eingeeengt.

Das embryonale Knochengewebe des Os frontale zeigte nach Überwindung eines Anfangsschocks eine gute Proliferation, die sich kaum von den Kontrollen unterschied. Epithelien des Darms und der Leber ließen auffällige ovalförmige Zellelemente in der Proliferationszone erscheinen, Ausdruck einer stattgefundenen Inhibition. Der Prozeß zeigte keine Progression.

Bei der Verringerung der Konzentration der Testsubstanz treten nun wieder vitale Lebensäußerungen auf.

Bei einer Dotation 1 gtt einer Lösung von 1 mg GM : 5 ml Lösungsmittel traten an den Bindegewebs-Explantaten keine Zeichen einer Beeinträchtigung der Mitose auf. Bei einer weiteren Verringerung der Konzentration durch Erhöhung des Lösungsmittel-Anteils auf 10 bzw. 20 ml trat eine auffallende Stimulation an die Stelle der Inhibitionen, die auch über eine längere Kulturzeit erhalten bleibt. Allerdings waren die Zellen der äußersten Wachstumszone, diese Zellen werden unmittelbar mit dem Antibiotikum konfrontiert, in ihrer Zellachse verkürzt, gestaucht und viel Testlösung war diffundiert. Die Kontrollen im Gegensatz zeigten die schlanken Zellformen der Fibroblasten.

Epithelexplantate der Leber und der Epidermis reagierten mit Histiolyse und Lyse der Wachstumszone. Die Wachstumszone der Epidermis ist durch zahlreiche Lysefoci unterbrochen. Bei der Erhöhung der Konzentration mußte man damit rechnen, daß zytotoxische Effekte auftraten, die über pathologische Zellformen bis zur Inhibition führten.

Während bei einer Konzentration von 2 mg GM : 1 ml Lösungsmittel noch die Reaktion der Zellen und Gewebe in einer Verzögerung der Mitose (Mitosis retardata) eruiert wurde, konnte durch Erhöhung der Konzentration auf 3 bzw. 4 mg : 1 ml die Mitose vollständig inhibiert werden. 5 mg GM : 1 ml Lösungsmittel hebt bei allen untersuchten Geweben jede nur denkbare Zellvitalität auf. Die Toxizität des GM oder seiner Metaboliten unterdrückt die Vitalität der Einzelzelle vollkommen.



Die Tests mit den großen Verdünnungen, wie 1 mg GM : 50 bzw. 100 ml Lösungsmittel zeigten ähnliche Ergebnisse: Das Antibiotikum verzögert auch noch in größter Verdünnung die Mitose bemerkenswert. Das Zellbild der dreidimensional proliferierenden Fibroblasten war so verändert, daß es eher einem zweidimensionalen Epithel glich. Das Knochengewebe des Os frontale dagegen proliferierte mit einer ungehemmten hohen Mitose-Rate.

Hohe Konzentrationen der Testsubstanz bedingen hohe Ausfallsreaktionen des Testgewebes. So mußten Konzentrationen von 10 mg, 20 mg und 40 mg : 1 ml Lösungsmittel als profunde Inhibitoren wirken. Nach der Konfrontation 1 gtt einer Lösung von 20 mg GM : 1 ml Lösungsmittel zeigte sich eine auffallende Metamorphose: Die Fibroblasten waren dick und verkürzt und wandelten sich in Rundzell-artige Formen als Zeichen der Abwehr um.

Koronargefäß-Kulturen zeigten keine geschlossene, sondern eine sehr aufgelockerte Wachstumszone mit einzeln büschelig stehenden Fibroblasten. Die Wachstumspotenz des explantierten Os frontale ist sehr hoch und wird auch durch hohe Konzentrationen nicht vollkommen unterdrückt. Die Proliferationspotenz beschränkt sich auf einzelne prominente zum Teil büschelig stehende "Riesensammel-Osteoblasten", Riesenformen, die durch das Zusammenfließen vieler einzelner Zellkörper entstehen.

Die Epithelien des Darmes reagierten auf so hohe Dosen mit einem Mitosestop.

Die Tests mit 1 gtt der Lösung von 40 mg GM : 1 ml Lösungsmittel waren reine Routinearbeit. Erwartungsgemäß zeigten alle Kulturen eine profunde Inhibition der Zellproliferation.

Diese Zellwirksamkeit des Gentamycins auf Fibroblasten- und Epithel-Gewebe vom embryonalen Huhn erschien gerechtfertigt, denn es besteht vielleicht ein Unterschied in der direkten Konfrontation zwischen dem Antibiotikum und dem Explantat. Die Resorption, die biologische Transformation, die Elimination und das Diffusionsvermögen in das Gewebe erklären diese Diskordanz.



Nach WEINSTEIN (3) liegt die Dosis der Hemmung bei 0,8 mg/kg, das bedeutet = 0,8 µg/ml Nährmedium.

Bei einer Einzeldosis von 0,9 mg/kg Körpergewicht i.m. erhält man Blutspiegel von etwa 4,5 µg/ml, einer Konzentration, die in vitro das Wachstum der meisten gram-negativen und gram-positiven Mikroorganismen inhibiert. (4, 5 und 6)

Eine alkalische Wasserstoffionenkonzentration (pH) erhöht die Aktivität des Antibiotikums. Die Gewebediffusion ist dann wesentlich erhöht, aber im Muskel, in der Milz und der Leber sind die Konzentrationen niedriger als im Serum. (7)

In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde versucht, die Zytotoxizität des GM auf embryonale Gewebe und Zellen festzustellen. Neben Bindegeweben wurden auch Knochengewebe und Epithelgewebe mit vielen Konzentrationen (siehe Tabelle) konfrontiert. Dabei konnte sowohl eine zytostatische, eine zytotoxische und auch eine stimulierende Wirkung des Antibiotikums auf die proliferierenden Zellen eruiert werden.

Bei feingeweblichen Untersuchungen wurde in der Interphase eine beginnende Vakuolisierung des Zytoplasmas nach zytotoxischer Einwirkung beobachtet.

Auf eine direkte oder indirekte Wirkung auf die Nukleinsäuren konnte nur aus der inhibierten Zellproliferation geschlossen werden, eine Blockierung der Prophase wäre nicht auszuschließen.

## B. GENTAMYCIN und Nierenepithel

Der Einsatz des GM auch bei pathologischen Zuständen der Nieren läßt die Frage berechtigt erscheinen, ob es nicht mögliche Irritationen des Nierengewebes bedingen könnte. Um dieser Nebenwirkung einer antibakteriellen Substanz auf den Grund zu gehen, wurden diese Untersuchungen ausgeführt. Nierengewebe von 12 - 13 Tage alten Hühnerembryonen wurden lege artis den Embryonen entnommen und in vitro mittels der Deckglaskultur kultiviert. In der 1. Passage erhielt jede Kultur 1 gtt einer Lösung von 1 mg GM : 1 ml Lösungsmittel. Während der mikroskopischen Prüfung, nach 48 Stunden Kulturzeit, konnte eine auffallend gute Epithelproliferation, ohne Hemmeffekt, mit kleinen Lysefoci, eruiert werden.

Wurden 2 mg GM : 1 ml Lösungsmittel in 1 gtt den Kulturen gegeben, so war an den Schnittkanten keine oder nur eine geringe Rundzellproliferation auffallend. Nach 48 Stunden veränderte sich das Zellbild wieder: Neben einer inhibierten Zellproliferation trat auch eine gute Zellvermehrung auf. Aber auch hier, ähnlich wie beim Os frontale, nur einige Sammel-Epithelzellen. Die geschlossene Epithelmembran trat zugunsten einiger prominenter Riesen-Sammelzellen zurück.

Bei einer Konzentration von 5 mg/1 ml Lösungsmittel kann nach den Ergebnissen mit embryonalen Epithel-Kulturen eine profunde Inhibition am Nierenepithel erwartet werden, die sich dann auch in einem geringen Epithelzellwachstum und Rundzellen an den Schnittkanten äußerte. Nach 72 Stunden scheint ein Stillstand der Proliferation eingetreten zu sein.

Eine Konzentration von 1 mg GM/10 ml wirkt auch noch auf die Mitose, denn auch nach 48 Stunden Kulturzeit konnte nur eine geringe Proliferation eruiert werden. Die starken proteolytischen Prozesse verhindern noch zusätzlich die Ausbildung einer geschlossenen Epithelmembran. Nur

einzelne prominente Epithelzapfen erscheinen an den Schnittkanten. Eine Konzentration von 1 mg GM/20 ml Lösungsmittel erzeugt eine auffallend starke Proteolyse. An den Schnittkanten nur einzelne Zellen, die aber auch der toxischen Einwirkung des GM oder seiner Metaboliten zum Opfer fallen. Auch eine Lösung von 1 mg/30 ml läßt noch keine Regression von der Inhibition zu. Eine Testkonzentration von 1 mg GM/2 ml Lösungsmittel führt nur zu einer zellulären Unruhe an der Schnittkante. Sie läßt aber keine Proliferation und Migration von Zellen in die Wachstumszone zu. Die toxische Wirkung verhindert jegliches Festsetzen von Zellen in der Wachstumszone oder an der Peripherie.

Wurde Nierengewebe mit niedrigen Konzentrationen konfrontiert, so reichte der Reaktionsbereich nach 24 Stunden von der Rundzellproliferation bei einer Konzentration von 1 mg GM : 5 ml bis zu einer Unruhe an der Schnittkante, bei 1 mg GM : 150 ml Lösungsmittel. Nach 4 Tagen hatte sich das Bild entscheidend geändert: Um das Explantat zieht sich ein Saum von Epithelzellen, keine geschlossene Wachstumsmembran sondern nur Zellhäufchen. Bei der hohen Verdünnung von 1 mg : 150 ml zeigte sich ein breiter Saum von Zellen, "mono-layer"-artig konfiguriert mit guter Proliferation.

Eine Konzentration von 1 mg GM : 200 ml Lösungsmittel bestätigte diese Untersuchungen: Geringes bis mäßig-gutes Epithelwachstum. Eine Konzentration von 20 mg GM : 1 ml Lösungsmittel schloß praktisch jede zelluläre Aktivität aus.

PENICILLIN und STREPTOMYCIN werden seit langer Zeit bei der Zell- und Gewebekultur zur Abwendung jeglicher Infekte verwendet, aber STRM wird rasch durch alkalisches pH zerstört und PENICILLIN ist extrem instabil sowohl in saurem als auch alkalischem pH. Bei längerer Verweildauer werden Gewebeexplantate durch die Abbauprodukte angegriffen. GM hat biologische und biochemische Eigenschaften, die es gleichwertig oder sogar noch besser an die

Seite von PENICILLIN und STRM stellt.

Mit 50  $\mu$ g/ml ist GM bakterizid für viele Bakterien und stabil bei allen pH-Werten.

Der Effekt von GM auf das Wachstum von humanen diploiden Lungenfibroblasten wurde eingehend untersucht. (8) Dabei wurde ein bestimmter Zellstamm in EAGLEs Medium mit 10 % Kälberserum und L-Glutaminzusatz verwendet. (9) Als Zusatz gab es 100 i.E. Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin. Die Einsaat betrug  $2 \times 10^5$  Zellen pro Kulturflasche. Bei 1  $\mu$ g/ml und bei 10  $\mu$ g/ml gab das Handelspräparat von GM eine etwas größere Stimulierung des Wachstums als die Reinsubstanz. Bei 1  $\mu$ g/ml war die Zellproliferation zwischen den Tests und den Kontrollen fast gleich. Bei 10  $\mu$ g/ml wuchsen die Zellen besser, ihr Wachstumspotential war erhöht: 35 Zellteilungen gegenüber nur 23 Mitosen bei den Kontrollen. Das Handelspräparat war bei 100  $\mu$ g/ml und 500  $\mu$ g/ml sehr toxisch und 500  $\mu$ g inhibierte vollständig. (8)

Zytotoxische Effekte auf sich aktiv vermehrende Zellen der Rhesus-Affen-Niere, auf Zellen des Stammes HeLa und auf humane Amnionzellen wurden erwartet und daher statt mit 100 i. E. Penicillin und 100  $\mu$ g/ml STRM, mit GM 50  $\mu$ g/ml behandelt. Testzellen wuchsen gut, wie jene, die in einem Kontrollmedium mit Penicillin und STRM behandelt wurden. (10)

Zellstämme vom Menschen, vom Hamster, von Maus, Katze und Affen, Fisch und Rindern wurden mit der gleichen Dosis behandelt. Keine toxische Einwirkung war festzustellen. (11) In der für die Gewebekultur angegebenen GM-Konzentration ist GM auch weitgehend untoxisch für Zellkulturen. (12)

An Geweben und Zellen des zentral-nervösen Netzwerks des akustischen Systems beginnt die toxische Einwirkung bei einer Dosierung von 10 x 20 mg/kg Körpergewicht. Bei einer Dosis von 10 x 150 mg/kg K.G. ist peripher und zentral eine profunde Schädigung des gesamten akustischen Systems morphologisch und elektrophysiologisch signifikant

nachweisbar. Die ototoxischen Schäden ähneln denen des **STREPTOMYCINS**. (13)

GM besitzt ähnlich wie **STRM** eine deutliche Ototoxizität, die wir bei unseren Untersuchungen nicht feststellen konnten, da wir kein embryonales Ohrgewebe verarbeitet haben. Die nephrotoxischen Effekte können wir bestätigen, denn ein hoher Enzymausstoß und ausgesprochen mitotoxische Effekte wurden an unseren Gewebekulturen ausgelöst.

Das antibakterielle Wirkungsoptimum liegt bei pH 7,8.

(14) Die optimale Wachstumspotenz von embryonalem Gewebe reicht von pH 7,2 bis 7,8.

Der Wirkungsmechanismus des GM ist nicht völlig geklärt. Bei proliferierenden Keimen verfälscht GM die Proteinsynthese durch Änderung des Aminosäure-Einbaues. (15)

Verschiedene Na-, K- und Ca-Salze, Carbonat, Sulfat, Chlorid, Phosphat und Nitrat reduzieren mit steigendem Gehalt im Nährmedium bis über 30-fach die Aktivität des Antibiotikums. Die Häufigkeit toxischer Effekte ist dosisabhängig.

Bei diesen Untersuchungen kam es vor allem darauf an, die nephrotoxische Wirkung des **GENTAMYCINS**, von der schon viele Beiträge in der Literatur handeln, festzustellen. Eine Nierenschädigung beim Menschen ist nur in etwa 2 % zu erwarten, vor allem dort, wo eine Überdosierung erfolgt oder wo das Antibiotikum auf eine vorgeschädigte Niere trifft. Entscheidend ist die glomeruläre Filtration; ist diese wesentlich herabgesetzt, so muß sie für die Dosierung des GM respektiert werden. (16)

Aus den hier vorgelegten Untersuchungen läßt sich folgendes eruieren: Sehr hohe Dosen schädigen die Proliferation von Nierenepithel, niedrige Konzentrationen wirken bakterizid auf jegliche Kontamination, aber sie schädigen nicht das Nierenepithel.

Ein Punkt verdient Aufmerksamkeit beim GM: Das Risiko der Ototoxizität bei an Niereninsuffizienz leidenden Patienten. (17)

Wegen ihrer reichen Vaskularisation ist die Niere, auch das embryonale Nierenexplantat, den toxischen Agentien besonders ausgesetzt. Diese verursachen Schäden durch direkte Wirkung oder indirekte Effekte. (18)

Wie sind aber unsere Befunde zu erklären?

Sollten da nicht in vitro bei einem längeren Verweilen am Instillationsort doch metabolische Vorgänge für die Mitoseinhibition verantwortlich sein?

### C. GENTAMYCIN und die Haut

Eine Konzentration von 10 mg GM : 1 ml Lösungsmittel stellt auch für ein Hautexplantat vom 12 Tage alten Hühnerembryo eine so starke Belastung dar, daß keine Proliferation möglich ist. Die Mitose wird so gründlich inhibiert, daß auch eine ausgeprägte Auswaschung der Metaboliten keine Veränderung bringen kann.

Auch eine Halbierung der Konzentration auf 5 mg GM : 1 ml führte nur zum Erscheinen einzelner Zellspitzen nach insgesamt 72 Stunden.

Erst eine Reduzierung der Wirkstoff-Konzentration durch Erhöhung der Menge des Lösungsmittels, 1 mg GM : 10 oder 20 ml führte bei diesen Konzentrationen am Hautepithel und am Hautbindegewebe zu einem breiten Fächer von Wachstumsbildern, der von guter Zellproliferation bis zum stimulierten Wachstum reichte.

Bei einer Konzentration von 1 mg GM : 1 ml Lösungsmittel erhielt Haut vom 9 Tage alten Hühnerembryo 1 gtt dieser Lösung. Neben einer starken Proteolyse als Abwehrreaktion konnte nur ein mäßiges Wachstum von Hautzellen festgehalten werden. Diese Wachstumszone wurde später durch die proteolytische Fermentreaktion aufgelöst und durch sekundäres Wachstum aus der Tiefe des Explantats ersetzt.



Bei einer Konzentration von 1 mg GM : 2 ml Lösungsmittel ergab sich 24 Stunden nach der Dotation nur eine geringe Rundzellproliferation an den Schnittkanten. Nach weiteren 24 Stunden, das Antibiotikum war tiefer in das Gewebe eingedrungen, konnte das Bild einer mäßig-guten Epithelzellproliferation mit geringer Lyse des Mediums eruiert werden. Nach 72 Stunden Kulturzeit erschien eine Zellmorphie, die in ihrer Form als fast stimuliert zu bezeichnen war. Epithelzell-Wucherungen waren größer als bei den unbehandelten Kontrollen.

Mit der Erhöhung der Menge der Testsubstanz: 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg und 10 mg GM : 1 ml Lösungsmittel zeigte das Bild eine profunde toxische Einwirkung des Antibiotikums in Form des Mitosestops.

Mit der Abnahme der Konzentration mußte man mit der Zunahme der Zellproliferation bis zur Stimulation rechnen. Aber hier trat ein unerwarteter Effekt auf: Wenn man sehr empfindliche Kopfhaut mit 1 gtt einer Lösung von 1 mg GM : 50 ml Lösungsmittel versetzt, so zeigt sich das Bild einer Auflösung der Federpapillen, die sehr empfindlich auf externe Reize reagieren. Die Auflösung erfolgt auf dem Wege eines langsamen Abtropfens der Zellen, nach fermentativer Auflösung der Federpapillen und Abwanderung der Einzelzellen. Ebenso gibt es bei dieser Konzentration auch gute Proliferation von Hautepithelien. Bei Konzentrationen von 1 mg GM : 100 resp. 200 ml Lösungsmittel ergibt sich das Bild einer guten bis zu einer stimulierten Zellmigration.

Eine Konzentration von 20 mg GM : 1 ml Lösungsmittel kann nach den bisher eruierten Ergebnissen nur zu einer profunden Mitoseinhibition führen. Durch die Ausscheidung eines GM-Metaboliten wird das Medium unklar.

Auf das Organsystem der Haut muß hier bevorzugt eingegangen werden, denn an der kranken Haut wird das GENTAMYCIN im stärkeren Maße angewendet; daher diese Untersuchungen besonders auch an embryonaler Haut. Es zeigte sich hier eine merkbare Inhibition der Mitose und man kann nicht



umhin, an eine Metabolisierung oder Aufspaltung des GENTAMYCIN in seine Einzelkomponenten, die zur Inhibition der Mitose führen, zu glauben.

Die Fortschritte der Molekularbiologie brachten Licht in die zellphysiologischen Vorgänge der Antibiotika-Wirkung, und die Biochemie hat unser Wissen vom Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus der Antibiotika erweitert. (19)

Auf Grund der hier vorgelegten Experimente erscheint es nicht ausgeschlossen, daß GENTAMYCIN nicht nur auf die Proteinsynthese von Mikroorganismen einwirkt, sondern auch durch besondere Angriffspunkte in die Protein- als auch die Nukleinsäure-Biosynthese von embryonalen Zellen eingreift.

Die in vitro-Pharmakologie der Amino-Glykosid-Antibiotika hat ihre Grenzen: Sie kann nur die direkten Effekte ihrer Einzelsubstanzen auf die embryonale Zelle anzeigen. Der zellwirksame Effekt der Antibiotika kann durch das Mikroskop beobachtet und mikrofotografisch dokumentiert werden.

Literaturverzeichnis : Diskussion 1) GENTAMYCIN

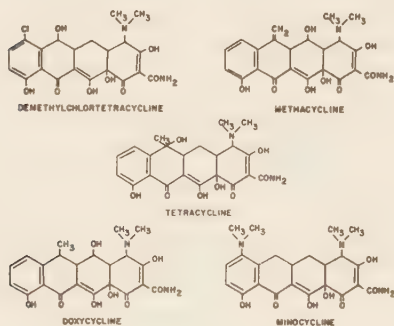
- (1a) WEINSTEIN, M.J. Gentamicin, a new antibiotic complex  
LUEDEMANN, G.M. from Micromonospora.  
ODEN, E.M. J. Med. Chem. 6, 463-464 (1963)  
WAGMAN, G.H.  
ROSSELET, J.P.  
MARQUEZ, J.A.  
CONIGLIO, C.T.  
CHARNEY, W.  
HERZOG, H.L.  
and BLACK, J. :
- (1b) WEINSTEIN, M.J. Gentamicin, a broad spectrum anti-  
LUEDEMANN, G.M. biotic complex.  
ODEN, E.M. Antimicrob. Ag. Chemother. 1-7, (1963)  
and WAGMAN, G.A. :
- (2) SCHAFFNER, C.P. zitiert aus WALTER/HEILMEYER :  
DONOVAN, J.E. Antibiotikafibel.  
und GEORGIADIS, M.P.: Ann. Rep. Rütgers Inst. Microbiol.  
1964/65, p. 23
- (3) WEINSTEIN, M.J. : Experimental background and bacte-  
riology of Gentamicin.  
First Intern. Symp. Paris, pp 9-18  
(1967)
- (4) SARRE, St.G. Mode of action of Gentamycin.  
and HAHN, F.E. : Transactions N.Y. Acad. Sci. March  
1967, p. 575
- (5) MILANESI, G. Studies on the mechanism of action  
and CIFERRI, C. : of gentamicin. Effect on protein  
synthesis in cell free extracts of  
E. coli. Biochemistry 5, 3926-3935  
(1966)

- (6) BLACK, J. Pharmacology of gentamicin, a  
CALESNICK, B, new broad-spectrum antibioticum.  
WILLIAMS, D. Antimicrob. Ag. Chemother.  
and WEINSTEIN, M. J. : 138-147 (1963)
- (7) VIC-DUPONT Place actuelle de la Gentamycine  
DUVAL, J. en pathologie infectieuse. Bilan  
VACHON, F. de 18 mois d'utilisation à la  
et CARBON, C. : cliniques des maladies infectieuses.  
Mai 1966-Décembre 1967.) La Presse  
Méd. 76, pp. 1307-1310 (1968)
- (8) LITWIN, J. : The effect of commercial and  
pure Gentamycin on the growth  
of human diploid lung fibro-  
blasts. Acta path. microbiol.  
scand. Sect. B. 78, 273-276 (1970)
- (9) EAGLE, H. : Amino acid metabolism in mamma-  
lian cell cultures.  
Science 130, 432-437 (1959)
- (10) CASEMORE, D. P. : Gentamycin as a bactericidal  
agent in virological tissue  
cultures. J. Clin. Path. 20,  
298-299 (1967)
- (11) SCHAFER, Th. W. Evaluation of Gentamicin for  
PASCALE, A. use in virology and tissue  
SHIMONASKI, G. culture. Appl. Microbiol. 23,  
and CAME, P. E. : 565-570 (1972)
- (12) RUDIN, A. Antibacterial activity of  
HEALEY, A. Gentamicin sulfate in tissue  
PHILLIPS, C. A. culture.  
GUMP, D. W. Appl. Microbiol. 20, 989-990 (1970)  
and FORSYTH, B. R. :

- (13) SODA, T. Die Ototoxizität von Gentamycin-  
HOLZ, E. sulfat.  
und STANGE, G. : Arzneim.-Forsch. 18, 824-827 (1968)
- (14) WAHLIG, H. : Methoden und Probleme der mikro-  
biellen Kontrolle pharmazeuti-  
scher Zubereitungsformen am  
Beispiel des Gentamycins.  
Zbl. Bakt. I. Orig. Suppl.-Heft :  
Arbeitsmethoden und aktuelle  
Ergebnisse der technischen  
Mikrobiologie.
- (15) WALTER, A. M. Antibiotika-Fibel.  
und HEILMEYER, L. : 3. Aufl. G. Thieme-Verlag, Stuttgart  
1969
- (16) NOVOTNY, Z. Klinische Erfahrungen mit dem  
und MOESCHLIN, S. : Breitspektrum-Antibiotikum  
Gentamycin (1969-1970).  
Schweiz. Med. Wschr. 102, 24-29 (1972)
- (17) VACHON, F. Bilan de six années d'utilisation  
WITCHITZ, J. de la gentamycine en réanimation  
BOUSSER, P. médicale. (1966-1972)  
et VIC-DUPONT : Schweiz. Rdsch. Med. 62, 543-547  
(1973)
- (18) LEBLANC, A. La néphrotoxicité des médicaments  
et VERNET, A. : Schweiz. Rdsch. Med. 62, 31-37, 59-63  
und 93-100 (1973)
- (19) DREWS, J. : Antibiotika : Hemmstoffe der  
Proteinsynthese.  
Med. Klin. 61, 81-86 (1966)

## TETRACYCLINE

Die einzelnen Spezies der Tetracyclin-Gruppe weisen - entsprechend ihrer chemischen Konfiguration - einige zum Teil geringgradige Unterschiede in der Wirkungsintensität, den chemisch-physikalischen Eigenschaften, der Resorption, der Diffusion und der Exkretion auf.



### F.9. Formeln der Tetracycline

Um aber diese feinen Unterschiede feststellen zu können, wurden mit allen erreichbaren Fabrikationspräparaten Untersuchungen an embryonalen Geweben angesetzt.

#### A. Tetracyclin-Hydrochlorid = Hostacyclin "HOECHST"

Explantate des embryonalen Kardialmuskels wurden mit 0,025 mg in 1 gtt einer TYRODE-NährLösung angesetzt. Es zeigte sich nach 48 Stunden Kulturzeit eine starke bis mäßige, aber doch inhibierte Proliferation.

Koronargefäß-Explantate reagierten auf 2,5 µg mit einer feinfaserigen Proliferation, die aber nach der Progression des Tetracyclinhydrochlorids (TCHC) in die Tiefe

des Explantats inhibiert wurde. Epidermis-Explantate, als Bindegewebs-Epithel-Verband sehr stark proteolytisch potenziert, reagierten auf den Zusatz mit einer verstärkten fermentativen Aktivität und eines durch den Zusatz entstandenen Metaboliten in Richtung auf die Verzögerung der Mitose.

Wurden Kardialmuskel-, Epidermis- Koronargefäß- und Darm-Explantate mit 1 gtt einer Lösung von 100 mg "Hostacyclin" : 100 ml Tyrode-Lösung angesetzt, so ergab sich sowohl bei den Bindegeweben als auch bei den Epithelien eine Inhibition der Zellproliferation. Wurden Koronargefäß- und Darmfragmente mit  $0,2 \mu\text{g}$  der Testsubstanz konfrontiert, so entstand zuerst eine Hemmzone, die aber überwunden wurde, neues Gewebe wuchs durch sie hindurch oder über sie hinweg.

Wenn  $0,25 \text{ ml}$  der obigen Lösung mit dem Bindegewebe vom Kardialmuskel, den Koronargefäßen und der Haut in der 1. Passage konfrontiert und auch den Darmepithelien zugefügt wurde, so ließen sie das Bild einer profunden Inhibition erkennen.

A<sub>1</sub> . Mit einem anderen Tetracyclin-Hydrochlorid, dem "TETRACYN-Pfizer" wurden zum Vergleich Untersuchungen angesetzt.

Erhielt Epidermis vom 9 Tage alten Hühnerembryo 1 gtt einer Lösung  $1 \text{ mg}/1 \text{ ml}$ , so erfolgte eine starke kaum inhibierte Zellproliferation. Wurde aber die Konzentration auf  $2 \text{ mg}/1 \text{ ml}$  erhöht, so versagte die Zellproliferation, denn es war eine profunde Inhibition eingetreten.

Kardialmuskel-, Leber- und Magen-Gewebe reagieren anders als die Epidermis mit einer Inhibition auf  $1 \text{ mg}/1 \text{ ml}$ . Wurden Os frontale, Koronargefäße und Haut (12 Tage) mit einer Konzentration von  $2 \text{ mg}$  resp.  $4 \text{ mg}/1 \text{ ml}$  angesetzt, so fiel ein brauner Metabolit aus. Eine profunde Inhibition war die Folge.

B. Oxytetracyclin-Hydrochlorid "TERRAMYCIN Pfizer"

Embryonale Körperhaut (9 Tg) reagiert auf eine Konzentration von 1 mg/1 ml Nährlösung mit einer Inhibition, eine ähnliche Reaktion wie beim Tetracyclin-Hydrochlorid. Wie ander fielen die Versuche mit der gleichen Konzentration an der Kopfhaut (12 Tg) aus. Eine mäßige bis gute, kaum inhibierte Proliferation an der Schnittkante, aber auffällig eine starke Proteolyse.

Narbengewebe vom Menschen erhielt die gleiche Dotation und auch hier trat eine gute Proliferation von neuem Zellgewebe ein. Auffallend die dunkle Pigmentierung durch ausfallende Tetracyclin-Metaboliten. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 2 mg/1 ml tritt sowohl bei dem Narbengewebe als auch an der embryonalen Hühnerhaut eine Inhibition ein. Beim Oxytetracyclin-Hydrochlorid (OTC) tritt stärker als bisher die Ausfällung eines braunen Metaboliten hervor. Es muß ein spezifisch für diese Kulturmethode entstehender Metabolit sein, denn die sonst etwa entstehenden Metaboliten werden im Organismus durch den Blutstrom ausgeschwemmt. Hier ist nur eine begrenzte Mikrozirkulation im Plasma-Clot-System möglich, eine Verdünnung wie in situ besteht nicht.

Humanhaut wird durch geringe Konzentrationen von 20 mg/100 ml physiologischer Nährlösung oder 20 mg/500 ml zur Zellproliferation stimuliert. Auch ein Vergleich mit embryonaler Hühnerhaut erbringt das gleiche Ergebnis. Diese bisherigen Ergebnisse mit den drei Präparaten sollen mit Resultaten aus der Weltliteratur verglichen werden.

Die TETRACYCLIN-Wirkung soll hier umfassend betrachtet werden, nur bei besonders hervortretenden Reaktionen soll auf die spezielle chemische Struktur und Wirksamkeit hingewiesen werden.

Die TETRACYCLIN-Wirkung erstreckt sich auf gram-positive und gram-negative Mikroorganismen, effektiv gegen einige große Viren. Sie inhibiert die Vermehrung der Microben, indem sie in die Synthese der Bakterienproteine eingreift.



Die molekularen Mechanismen bewirken die Hemmung der Proteinsynthese. Möglicherweise der Aminosäure-Übertragung von der Aminoacyl-tRNA auf Ribosomen-Proteine. (1)  
Sie hemmen den Einbau der D-Glutaminsäure, vielleicht auch des Lysins in die Zellwand der Bakterien.

TETRACYCLINE wirken wahrscheinlich auch auf Bakterien-Ribosomen und bilden mit polyvalenten Metallionen Komplexe = Chelate, und diese könnten für die hemmende Wirkung auf die Proteinsynthese von Bedeutung sein. (2)

Ähnlich wie bei anderen Untersuchungen wurde mit einer improvisierten "one-step tissue toxicity technic" das Antibiotikum Terramycin-HCl ausgewertet. Die höchste "killing dilution" von Terramycin beträgt an embryonale Hühner-Herz-Gewebe 1 : 600. (3)

Einer der wesentlichen Fakten beim Studium therapeutisch wirksamer Substanzen ist die Determination ihrer toxischen Potenzen. Neben der Sammlung von klinischen Erfahrungen gibt es auch die Möglichkeit, den Reizeffekt auf der Conjunctiva oder der Cornea des Kaninchen-Auges zu untersuchen.

Aber auch an der menschlichen Haut und der embryonalen Milz des Hühnchens (18 Tg) können vergleichbare toxische Effekte eruiert werden, die mit klinischen Ergebnissen korrelieren. Die "minimal inhibitory dose" (MID) und die "least injurious dose" (LID) in  $\mu\text{g/ml}$  Kulturmedium bestimmen diese Untersuchungen.

Die LID für Menschenhaut betrug für AUREOMYCIN-HCl 105  $\mu\text{g}$  bis 210  $\mu\text{g/ml}$  für chicken spleen (Milz) 155 - 310  $\mu\text{g/ml}$ . Die MID für Humanhaut 830 - 1 250  $\mu\text{g/ml}$ , für chicken spleen 5 000  $\mu\text{g/ml}$ . (4)

Es bestehen enge Zusammenhänge zwischen diesen in-vitro-Resultaten und den klinischen Ergebnissen bei örtlicher Applikation von Antibiotika auf Haut und Schleimhäute.

(5) Ein schädigender Einfluß der Antibiotika auf den Wirtsorganismus durch Änderung des Gewebsumlieues = Terrainveränderung stehen hier zur Debatte. (6)

Aureomycin- und Terramycin-Studien verwendeten Kardialmuskul vom 9 Tage alten Hühnerembryo. 30 mcg Terramycin/ml leiteten eine Wachstumsdepression ein, 3 000 mcg/ml und höher inhibiert vollkommen die Proliferation der Embryonalzellen. Wurde embryonales Mäuseherz mit den Antibiotika konfrontiert, so genügen bereits beim Aureomycin 80 mcg/ml, um eine Depression der Zellproliferation einzuleiten, und 160 mcg/ml produzierten verschiedene zytologische Schäden.

Beim Terramycininitiierten 100 mcg/Terramycin/ml eine Depression und 200 mcg/ml bedingt eine komplette Inhibition des Wachstums. (7)

Hühnerembryonen (9 - 11 Tage alt) wurde 1 mg kristallinen Aureomycins inoculiert. Nur in der Leber, in der Allantoisflüssigkeit und in den Membranen konnte eine gewisse Menge Aureomycin entdeckt werden, aber nicht im Gehirn und Kardialmuskel. (8)

Die TETRACYCLINE werden von Blutzellen aufgenommen, erkennbar an ihrer Fluoreszenz. Venöses Blut + 10 µg/ml und 1 mg/ml. Gelbe Fluoreszenz in den Leukozyten, keine in den Erythrozyten. Im Lymphozyten und polymorphnukleären Leukozyten fluoresziert der Nukleus mehr als das Plasma. Die starke Fluoreszenz des Nukleus könnte durch eine intensive Kombination des TETRACYCLINS mit der DNS entstehen. (9)

Die Bindung der TETRACYCLINE an die Ribosomen wurde untersucht. Die reversible Bindung an die Ribosomen ist wahrscheinlich relevant. (10)

TETRACYCLIN, 1500 i.E./0,5 ml, wurde in der Allantoisflüssigkeit von Eiern mit 10 - 11 Tage alten Hühnerembryonen am meisten gefunden. - (11)

TETRACYCLIN penetriert in Makrophagen von Albinomäusen, die i.p. 1 000 i.E. TETRACYCLIN erhielten. Höchste Konzentration nach 30 - 60 Minuten nach Anwendung. (12)

Toxische Effekte an Gewebekulturzellen wurden durch Dichlortetracycline erzielt. (13)

Die Aktivität von Chlortetracyclin (CTC) und Oxytetracyclin (OTC) wurde an Chick-Embryo-Fibroblasten mit zugesetzten

Staphylococcen studiert. Die Zellzahl der Mikroorganismen wurde in bestimmten Abständen bestimmt. Mit OTC (100 i.E./ml) wurde das flüssige Medium am 4. Tag steril, aber nach 5 Tagen hatte es seine Anfangswerte um das 24-fache überholt. (14)

Den Einfluß des CTC auf die immunologische Aktivität des Hühnchens wurde an der Milz und der Bursa Fabricius des Kükens offenbar. Niedrige und hohe Dosen, 50, 100 und 200 mg/kg haben keinen signifikanten Einfluß auf die Struktur und Reaktivität des lymphatischen Gewebes. (15) Bei unseren eigenen Untersuchungen wurden Kulturen der 12 - 16 Tage alten, embryonalen Milz mit TETRACYCLINEN in unterschiedlicher Dosierung angesetzt. Niedrige Dosen wurden toleriert, hohe Dosen führten zu einem Stillstand der Zellproliferation.

In Suspensions-Zellkulturen von embryonalen Hühnerherzfibroblasten konnte gezeigt werden, daß TETRACYCLIN mit zunehmender Konzentration die Inhibition stark steigert. (16)

TERRAMYCIN (TCM) verändert die Feinstruktur von HeLa-Mitochondrien. (17) Die TETRACYCLINE (TC) wirken wachstumshemmend auf Zellkulturen. (18) Sie zeigen Fluoreszenz in Säugetierknochen. (19)

AUREOMYCIN wurde zu embryonalem Hühnergewebe, die auf einer plastischen Membran in einem flüssigen Medium kultiviert wurden, zugesetzt. Von 15 Tage alten Hühnerembryonen wurden Herz, Lunge oder Hirn explantiert und angesetzt. Die Fibroblasten werden durch Aureomycin stark inhibiert, mehr als die explantierten Epithelien. Ein Ergebnis, das wir auf Grund unserer Untersuchungen vollauf bestätigen konnten. Bei 10 µg/ml war das Wachstum verzögert, bei 100 µg/ml komplett inhibiert. (20)

In einer vorläufigen Mitteilung wurde gezeigt, daß AUREOMYCIN die Respiration von Ratten-Leberhomogenaten zu inhibieren vermag. (21)

Nicht die Oxydation, sondern nur die Phosphorylierung wurde durch AUREOMYCIN inhibiert. (22)

Unter ähnlichen Bedingungen wurde die Atmung von Ratten-Leber-Mitochondrien gehemmt. (23)

Normale Ratten-Leber-Mitochondrien homogenisiert u.suspen- diert wurden durch AUREOMYCIN inhibiert. Phosphorilie- rung verbunden mit einer Oxydation der Zitronensäure- Cyclus-Substrate wird unter gewissen Bedingungen gehemmt.

(24) Die Inhibition der oxydativen Phosphodlierung in Tiergeweben durch AUREOMYCIN wird bestätigt. (25)

Neuere Bearbeitungen berichten von einer Bindung der Tetracycline an die Ribosomen in vitro. (26)

Die Potenz der TETRACYCLINE in vitro wird von einer Ein- setzung eines D-Ringes abhängig gemacht. (27)

Auch am Hühnerembryo wurde, ähnlich wie bei den eigenen Untersuchungen, der Effekt des TETRACYCLINS auf die Kno- chen des Hühnerembryos untersucht. Es fällt auf, daß auch bei den eigenen Untersuchungen die empfindliche Skelett- muskulatur auf die kleinsten Dosen sehr empfindlich an- spricht. (28)

Die selektive Lokalisierung der Tetracycline in den Mito- chondrien lebender Zellen, von Knochen und anderen Gewe- ben wurden untersucht. (29)

CTC und OTC werden durch das Blut gebunden, besonders durch die Plasmaproteine. Eine Hälfte wird durch die Nie- ren durch glomeruläre Filtration, der übrig bleibende Teil durch die Tubula sekretiert. (30)

In einer zytophotometrischen Studie wurde gezeigt, daß Neuroblasten und Erythroblasten von Hühnerembryonen nach Dosen von 2,5 mg/1 Ei den relativen Gehalt an DNA ernied- rigten. (31)

Der Effekt von TERRAMYCIN (TCM) auf normales, embryonales Hühnergewebe wird geschildert. 3 000 mcg TCM/ml Nähr- medium inhibieren die Zellproliferation vollständig. Bei 160 mcg/ml AUREOMYCIN bedingte bemerkenswerte Änderungen zytologischer Art an den betroffenen Zellen. TCM und AUREOMYCIN waren toxischer, wenn sie zu den in lebhafter mitotischer Teilung befindlichen Zellen gegeben wurden, als wenn sie zum Nährmedium zugesetzt wurden. (32)

AUREOMYCIN initiiert die Depression der Hühnerherz-Fibroblasten bereits mit 1  $\mu\text{g/ml}$ . Komplette Inhibition mit 1 000  $\mu\text{g/ml}$ . (33)

Auch mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  wird schon eine merkbare Hemmung der Zellproliferation erreicht. (34)

Das Os frontale in Kultur wird sehr stark bei 50  $\mu\text{g/ml}$  gehemmt und bei 4 000  $\mu\text{g/ml}$  vollständig inhibiert. (35)

Diese hier geschilderten biologischen Effekte werden aber nicht nur in der Gewebekultur gefunden.

Sechs und elf Tage alte Hühnerembryonen erhielten 1, 2, 3 und 4 mg eines Tetracyclins. Die Injektion wurde in die Allantois oder den Dottersack verabfolgt. Die höchste Konzentration wurde in der Leber, der Lunge und im Serum bei 11 Tage alten Hühnerembryonen gefunden. (36)

Die Dynamik der Antibiotika-Konzentrationen in der Allantois von 9 Tage alten Hühnerembryonen wurde untersucht. Vom Tetracyclin, vom Oxy- und Chlortetracyclin werden je 2 mg toleriert. (37)

An Embryonen des Huhns wurden die Effekte des Chlortetracyclins (CTC) festgestellt. Die Dosis, die sich als nicht-toxisch erwies, variierte zwischen 100 bis 400  $\mu\text{g}$  pro Hühnerembryo. (38)

Wurden Hühnerembryonen den klinischen Dosen der Tetracycline ausgesetzt, so konnte keine signifikante Sterblichkeit bei den Embryonen festgestellt werden. Obwohl die Substanz im ganzen Skelett eruiert wurde, waren keine teratogenen Änderungen im Knochen-Wachstum oder in der Gestalt der Embryonen aufgetreten.

Erst eine Erhöhung der Dosis um das Zehnfache löste Störungen im Knochenwachstum und andere Abnormitäten aus.

(39) Terramycin-HCl wurde an embryonalen Hühnerherz-Fragmenten vom 12 Tage alten Hühnerembryo ausgetestet. Die höchste Konzentration des Antibiotikums ergab kein Wachstum des Gewebes in vitro = es wurde als die "killing dilution" bezeichnet. Die höchste "killing dilution" des Antibiotikums für embryonale Hühner-Herz-Gewebe sind für

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Penicillin          | 1 : 12         |
| Streptomycin-Sulfat | 1 : 20         |
| Terramycin          | 1 : 600 . (40) |

Die Vierringsstruktur der Gruppe der Tetracycline ähnelt den Ronomycinen und dem Daunomycin. (41)

Die Tetracycline wirken wahrscheinlich vorwiegend auf den Mechanismus der Proteinsynthese und auf den oxydativen Stoffwechsel bzw. die Mitochondrien. (42, 43, 44)

Terramycin verändert die Feinstruktur von HeLa-Mitochondrien. (45)

Die Tetracycline wirken wachstumshemmend nicht nur auf Bakterien, sondern auch auf Zell- und Gewebekulturen. (46)

Inkorporierte Tetracycline in Amnionzellkulturen machen die Zellen photosensitiv. Geringe Dosen UV schädigen die mit Tetracyclinen behandelten Zellen stark. (47)

Über die Wirkung auf Leukozytenkulturen wurde berichtet. Bei sehr hohen Konzentrationen tritt eine Verklumpung der Chromosomen ein, ohne aber chromosomale Aberrationen nachweisen zu können. (48)

Tetracyclin hemmt die zellfreie Proteinsynthese im bakteriellen und tierischen System, in dem die Bindung der Aminoacyl-t-Ribonucleinsäure an das Ribosom verhindert wird. Wie manifestiert sich die unterschiedliche Spezifität der Tetracyclin-Wirkung auf Bakterien- und Säugertierzellen im zellfreien System? Der Gehalt an C<sup>14</sup>-markiertem Phenylalanin wurde bestimmt, nachdem es in ein zellfreies System aus der Rattenleber eingebaut und in Abhängigkeit von der Tetracyclin-Konzentration gebracht worden war. Im zellfreien System der Ratte ergibt sich für Tetracyclin eine geringere Hemmwirkung als bei den zellfreien E-coli-Systemen. (49)

Die Zugabe von Tetracyclin (20 µg/ml) zu embryonalen humanen Gewebekulturen wies keine Toxizität durch 11 Passagen auf. (50) Einmalige i.p. Gabe von Tetracyclin in subletaler Dosis führt zur Verfettung der Rattenleber.



Die Dilatation und Vesikulation des endoplasmatischen Retikulums und die Quellung der Mitochondrien sind die auffälligsten Veränderungen, die der Verfettung der Leberzellen vorausgehen. Diese Veränderungen sind unspezifisch und reversibel. (51)

Tetracyclin-Hydrochlorid wird von wachsendem Knochengewebe aufgenommen und festgehalten; durch die Fluoreszenz ist es unschwer zu erkennen. Embryonen von 8 - 12 Tagen Bebrütung wurden für die Versuche verwendet. Bei den jüngeren zeigt sich nach Dosen von 2,5 - 5 mg eine Verzögerung des Wachstums. (52)

Die Wirkung von Konzentrationen zwischen 10 µg/ml bis 2 mg/ml auf embryonale menschliche Leberzellen in der Gewebekultur wurde untersucht. Im Cytoplasma der Hepatocyten sind dichte Neutralfetteinlagerungen zu erkennen. (53) Mit der Zunahme des Gebrauchs von Antibiotika interessiert man sich immer mehr zu wissen, wie die Reaktionen dieser Substanzen auf die individuelle Zelle und die Gewebe darzustellen sind.

Aureomycin und Terramycin wurden am 9 Tage alten Hühnerherz ausgetestet, indem die Testsubstanz direkt in das Kulturmedium inkorporiert wurde. Eine Konzentration von Terramycin im Nährmedium von 3 000 mcg/ml und höher inhibiert die Proliferation der embryonalen Zellen vollständig. Der Effekt der Konzentration verläuft beim Terramycin mit 30 mcg/ml entsprechend der Konzentration auf "chick embryo heart tissue in culture", die eine Depression des Wachstums einleitet und der Konzentration, die eine vollständige Inhibition bedingt = 3 000 mcg. Tetracycline erscheinen daher relativ toxisch. Aureomycin in GEY's solution, zu Kulturen von Mäusefibroblasten gegeben, erzeugte feststellbare zytologische Unterschiede bei einer Konzentration von 160 mcg/ml. (54)

Penicillin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Streptomycin u.a. wurden in Dosen zu 0,5 bis 2,5 mg zur Prüfung der Toxizität Hühnerembryonen injiziert.



Oxytetracyclin und Tetracyclin ergaben mit 70 - 80 % die höchste Mortalität. Bei Penicillin und Chlortetracyclin 40 - 50 %. Penicillin hebt den Mitoseindex von 35,4 auf 47,5 ; Oxytetracyclin erniedrigt ihn bis 26,8. Die Zahl der Telophasen nimmt bis zu 300 % unter dem Penicillineffekt zu, Oxytetracyclin reduziert die Anzahl der Prophasen. (55) Wurden je 100 Einheiten/ml im Kulturmedium mit embryonalen Hühner-Herzfibroblasten konfrontiert, so wurden nach 10-maliger Auswaschung der Zellen mit HANK's Lösung 52,7 % des Tetracyclins, 43,2 % des Chlortetracyclins und 6,6 % des Oxytetracyclins im Zytoplasma zurückgehalten. Auffallend der große Teil des Oxytetracyclins, der ausgewaschen wurde. (56)

Die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von Tetracyclin-Hydrochlorid auf menschliche Leberzellen in der Kultur wurde licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Konzentrationen des Tetracyclins von 2 mg/ml und 1 mg/ml ließen bei allen Leberzellen unterschiedlich große Neutralfettablagerungen erkennen. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml zeigten ca. 50 % der Zellen deutliche Fettablagerungen im Zytoplasma. Niedrige Konzentrationen von Tetracyclin rufen keine Veränderungen im Zytoplasma der Leberepithelien hervor. (57) Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Tetracyclin (TC) über den mütterlichen Kreislauf in den fetalen Organismus gelangt, wo es im Skelett, und hier besonders in den Wachstumszonen eingebaut wird. Von hier aus nimmt es dann Einfluß auf die Osteogenese. Die Wirkung auf Knochenzellkulturen von Ulna und Radius, 12 - 16 Tage alter Mäuseembryonen wird untersucht. Basal Medium EAGLE (BME) in Earle's Salzlösung + 10 % inaktiviertes fetales Kälberserum und  $\text{NaHCO}_3$ , dazu in verschiedenen Konzentrationen 0,01 µg/ml - 100 µg/ml TC. Es trat eine Verschmälerung der Verkalkungszone ein. Der hemmende Effekt ist reversibel, es resultieren jedoch in allen Fällen Fehlbildungen der Knochenform. Der Verfasser nimmt an, daß auf Grund dieser Ergebnisse an diesen Kulturen die Gabe

von TC in vergleichbaren therapeutischen Dosen eine hemmende Wirkung auf die Mineralisation embryonaler Knochen ausübt. (58)

Alle TC enthalten mehrere phenolische Hydroxylgruppen und gehen daher mit Eisen III-chlorid eine rotbraune Farbreaktion ein, die auch bei unseren Gewebekulturen in starkem Maße beobachtet werden konnte. (59)

Die Eigenschaft der TC Fluoreszenz zu induzieren, ist dazu benutzt worden, seine Lokalisation in lebenden Zellen zu orten. Sowohl Tetracyclin, als Oxytetracyclin und Chlortetracyclin verbinden sich spezifisch mit den Mitochondrien von lebenden Zellen, hergestellt in Gewebekulturen oder aus frischen Organen. Affen-Nieren-Gewebezellen, gewachsen in Tissue Culture Medium (TCM) 199 mit 2 % Kälberserum und in Eagle's Basal Medium wurden 10 oder 20  $\mu\text{g/ml}$  Medium ausgesetzt. - Photomikrografische Aufnahmen dieser Zellen zeigten eine intensive Fluoreszenz der Mitochondrien, während alle anderen Zellbestandteile, wie Nuklei, Vakuolen, Zytoplasma und Zellgrenzen dunkel erschienen. 2 000  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin wurde erwachsenen Mäusen intraperitoneal injiziert. Nach 2 Stunden wurden die Tiere getötet und Gehirn, Leber und Milz entnommen. Frische Mikropräparate wurden hergestellt und wieder war das Tetracyclin in den Mitochondrien lokalisiert. Lebermitochondrien zeigten eine starke Fluoreszenz, während die Fluoreszenz von der Milz mittelmäßig war und das der Gehirnmitochondrien schwach.

Beobachtungen über die Verteilung der Fluoreszenz an lebenden Zellen wurden hergestellt, um den Austausch zwischen Tetracyclin-behafteten Mitochondrien und dem Nukleus während der Zell-Teilung zu studieren. Weitere Informationen könnten dadurch für den "locus of action" der Tetracycline erhalten werden für Fälle, wo Komplikationen entstanden während einer langen Therapie, z.B. Leberdegeneration zur Folge hätten. (60)

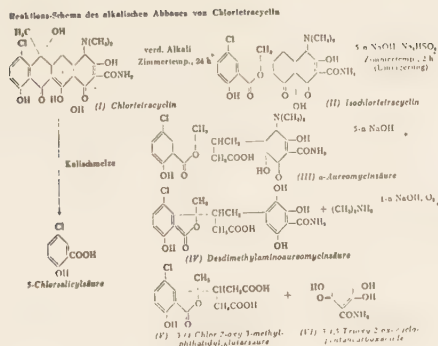
Wie vorher berichtet, wird Tetracyclin selektiv durch die Mitochondrien der lebenden Zellen akkumuliert und in vivo,<sup>50</sup> daß Nuklei, Vakuolen, Zytoplasma und Zellgrenzen während der Tetracyclin-Verteilung im Fluoreszenz-Mikroskop dunkler erscheinen. Diese zeigt an, daß von den vier Zellgrenzen zwei sehr permeabel sind (Zell- und Mitochondrien-Membran) und zwei nur leicht permeabel sind (nukleäre und vakuoläre Membran) für das Antibiotikum. (61)

Auf eine Besonderheit des AUREOMYCIN sollte hier noch einmal hingewiesen werden. AUREOMYCIN bildet mit Metallen Komplexe, deren Stabilität in Abhängigkeit vom verwendeten Metallion wie folgt abnimmt:  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ .

Die Komplexe sind grün bei Cu, rot bei Fe und gelb bei Co, Zn und Mn gefärbt. Aus Chlortetracyclin entsteht durch alkalische Spaltung einer C-C-Bindung eines enolisierten Ketons über eine intermediär auftretende Carboxylgruppe, durch Umlagerung ein Phthalid, das Isochlortetracyclin. Ketonhydrolyse und Bindung einer Carboxylgruppe der nicht konjugierten  $\beta$ -Diketon-Konfiguration führt zur Bildung von  $\alpha$ -Aureomycinsäure, die weiter über Desdimethylamino-aureomycinsäure zu einem Glutarsäure- und Cyclopentanderivat abgebaut wird. (62)

Warum beschreibe ich diesen Abbau so genau? : In der Kultur liegt vorwiegend ein alkalisches Milieu mit pH-Werten von 7,2 bis 7,4 vor. In den Untersuchungen müßten daher solche Derivate entstanden sein, die wiederum auf die Zellen toxisch einwirken. (s. Formelbild)

In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde versucht, eine Erklärung für die von uns beobachteten Zellreaktionen an Geweben vom embryonalen Huhn in der Kultur nach Zugabe von Tetracyclinen zu geben. Mit eigenen Untersuchungen wurde versucht, auch eine Erklärung für viele Ergebnisse der angeführten Autoren zu geben.



F. 10. Alkalischer Abbau von Chlor-Tetracyclin.  
Aus: H. VONDERBANK: AUREOMYCIN und ACHROMYCIN.  
Klinische Wirkungen und deren experimentelle  
Grundlagen - Arzneim.-Forsch. 6. Beiheft, 1956

In bakteriostatischen Konzentrationen unterdrücken die TETRACYCLINE die Bildung adaptiver Enzyme, sowie den mit der Proteinsynthese verbundenen Einbau von Aminosäuren. In 100-fachen bakteriostatischen Konzentrationen treten Seiteneffekte wie Hemmung der Gärung, des Glutaminsäure-transportes, der Nukleinsäure-Synthese deutlich hervor. Diese toxischen Effekte lassen sich vielleicht aus der hohen Affinität des TETRACYCLINS zu Schwermetallionen erklären. (63)

Nach dieser Einführung in die Problematik der toxischen Wirkung der TETRACYCLINE möchten wir auf Einzelheiten der einzelnen TETRACYCLINE eingehen, um sie mit unseren Untersuchungen an Gewebekulturen zu vergleichen und auch Versuche an jungen Versuchstieren zu erklären.

Von den OXYTETRACYCLINEN (OTC) ist bekannt, daß sie in therapeutischen Dosen lediglich geringe substrukturelle Veränderungen der Acinus-Epithelien hervorrufen. Hohe Dosen bzw. Überdosierungen führen zur Atrophie der Acini. (64)

Die Wirkung des TETRACYCLINS in verschiedenen Dosen von 10  $\mu$ g/ml bis 2 mg/ml auf menschliche Leberzellen in Kultur: Niedrige Konzentrationen rufen keine Veränderungen im Zytoplasma der Leberepithelien hervor. Bei Konzentrationen von 1 mg/ml und 2 mg/ml wiesen alle Leberzellen groß-tropfige Fettablagerungen auf. (65)

Eine Erscheinung, die wir auch bei unseren Untersuchungen an Lebergeweben feststellen konnten; darüber hinaus fanden wir noch bei sehr stark verfetteten Leberzellen Übergänge zur Zellnekrose.

Knochenmarkszellen vom Menschen erhielten 100  $\mu$ g/ml Tetramycin, das dann im Fluoreszenzmikroskop als starke gelbe Fluoreszenz wiederzufinden war. (66)

TETRACYCLIN verdrängt Wasser und reagiert mit dem Zellprotein, einer Wechselwirkung gleich, zwischen TETRACYCLIN und Kollagen. (67)

Nicht dialysiertes, nicht-hämolytisches Blut von Blutspendern + CTC-Hydrochlorid und  $\text{Ca}^{++}$  ergeben in vitro mit den Lipoproteiden des menschlichen Serums eine in Magnesiumchlorid lösliche Fällung. (68)

Auch die Antikörper-Bildung der Milzzellen wurde durch TCM inhibiert. CTC hatte einen profunderen Effekt als OTC und TCM. (69)

Die Ablagerung des TCM in Geweben mit hohem Calcium-Gehalt ist durch das Vermögen Chelate zu bilden, gekennzeichnet. Diese Chelatebildung mit polyvalenten Kationen ist eine charakteristische Eigenschaft der TETRACYCLINE. (70) OTC und TCM gehen diese Verbindung ein, wenn auch nicht mit gleicher Intensität. (71)

Bei nicht zu geringen Chelatemengen fluoreszieren Knochen<sup>im</sup> Licht. (72)

Auch die einzelnen Substanzen der Tetracyclin-Gruppe binden sich an Serum-Proteine, gefolgt von einer beachtlichen Reduktion ihrer biologischen Potenz. Während einige Experimentatoren behaupten, daß die primäre Bindung der Tetracycline am Albumin erfolgt, sprechen andere davon, daß die Tetracycline mit allen Proteinfraktionen

mit Ausnahme der  $\gamma$ -Globuline Komplexe bilden. Auch stellen andere wiederum fest, daß die Tetracycline sich sowohl mit  $\gamma$ -Globulin als auch mit Albumin zu einem Komplex verbinden. Bei therapeutischen Konzentrationen verbinden sich  $3/4$  des Tetracyclins mit Albumin. Mit hoher Affinität und geringer Kapazität und nach der anderen Seite mit niedriger Affinität und hoher Kapazität. Im Serum bilden ungefähr 40 % des Tetracyclins einen Komplex mit dem Protein und halten dadurch eine Verbindung zu den Lipoproteinen. Bei hohen Calcium-Konzentrationen vermag Tetracyclin Lipoproteine zu präzipitieren. (73)

Der Effekt des Tetracyclins auf Erythroblasten wurde an Knochenmarkskulturen untersucht. Wenn 50 oder 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  im Nährmedium angeboten wurden, dann wurde die Eisenaufnahme und die Inkorporation durch die Erythroblasten nicht verändert. Wenn 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tetracyclin angewendet wurden, dann wurde die Eisenaufnahme durch die Erythroblasten verändert. Tetracyclin vermindert die Eisenaufnahme, hat aber keinen Effekt auf die Eisenutilisation der Erythroblasten für die Häm-Synthese in diesen Knochenmarks-Kulturen. (74)

Die biologische Aktivität der Tetracycline unter Benutzung von Gewebekulturen wurde in großem Maße von russischen Forschern untersucht. (75)

Bei den vorliegenden Untersuchungen fällt es dem aufmerksamen Leser auf, daß auch sehr viele Untersuchungen mit der Wirkung der Tetracycline auf die Leber angesetzt wurden. Hierzu ein Autor, der auch die pathologischen Veränderungen an der Leber nach Tetracyclin-Dotationen untersuchte:

Oxy- und Demethyltetracyclin rufen eine mäßige, Chlor- und reines Tetracyclin eine beträchtliche Verfettung der Leber hervor. Gleichzeitig nehmen die behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ab. Die Verfettung geht mit einem beträchtlichen Eiweißverlust



der Leber einher. Die Verfettung ist Ausdruck einer Fettspeicherung durch Hemmung oxydativer Vorgänge. Eine eiweißkatabole Wirkung der Tetracycline ist der Grund für den Eiweißverlust. (76)

Die Diffusion als ein Faktor im nichtvaskulären Transport wurde durch Experimente an einem in-vitro-Modell demonstriert. Die Penetration von chemotherapeutischen Agentien in die Zellen wurde mit dem Begriff der "tissue concentration" also praktisch mit einer Gewebekonzentration festgelegt, aber den Autoren war es nicht möglich, die Menge eines Stoffes im Blut, in den extrazellulären und den intrazellulären Bestandteilen zu unterscheiden, besonders an exzidierten oder explantierten Geweben. (77)

Daß Antibiotika Säugetierzellen penetrieren und darin agieren können, ist seit den neuen Studien über den Aktionsmodus von gewissen Chemotherapeutika, hier werden besonders die Antibiotika angesprochen, klar. (78)

Weniger ist bekannt über die Einschleußung solcher Antibiotika in die Zelle und ihre intrazelluläre Metabolisierung, oder ihren Transport zu ihrem Wirkungsort, respektive ihrer "site of action". (79)

Vornehmlich embryonale Herzmuskel- und Epidermis-Explantate erhielten 0,05 ml einer Lösung von 275 mg "REVERIN": 100 ml physiolog. Nährlösung. Eine inhibierte Zellproliferation war die Reaktion auf diese Substanzkonzentration.

Embryonaler Kardialmuskel, Leber und Epidermis vom 8 Tage alten Hühnerembryo erhielten 1 gtt einer Lösung von 100 mg REVERIN : 100 ml physiolog. Lösung. Bei Bindegewebs- und Epithelkulturen eine Inhibition der Zellproliferation als Ausdruck einer zytotoxischen Einwirkung. Wurde 1 Testtropfen einer Lösung von 2 mg REVERIN : 20 ml physiolog. Nährlösung je Kultur gegeben, so konnte bei den Explantaten von Kardialmuskel, Haut, Os frontale und Koronargefäßen eine breite Palette von mäßig-guter bis sehr guter Proliferation festgehalten werden, bei



den weniger potenten Geweben des Herzmuskels war sie geringer als bei den stark mitotisch-aktiven Geweben des Os frontale und der Koronargefäße.

Auch Haut vom erwachsenen Menschen zeigt nach Dotation 1 gtt einer Konzentration von 2 mg REVERIN : 10 ml Lösungsmittel eine mäßige Hemmung der zellulären Aktivität. Nur einige aktive Zellhäufchen zeigten eine geringe Vermehrungstendenz.

Haut vom 12 Tage alten Hühnerembryo reagierte auf 2 mg : 20 ml ebenfalls mit einer guten Zellproliferation, die aber eine anfängliche Hemmung vermuten ließ. Eine anfängliche Zytostase wurde durch hohe Mitosepotenz überwunden. Eine Konzentration von 2 mg REVERIN : 50 ml Lösungsmittel führte bei allen Testgeweben zu einer gering-inhibierten Zellvermehrung.

Wurden Kardialmuskel, Koronargefäße, Os frontale, Leber und Haut (12 Tg) mit einer Lösung von 2 mg : 100 ml Lösungsmittel konfrontiert, so wurde an sämtlichen Kulturen eine starke Hemmung der Zellvitalität, eine starke proteolytische Aktivität mit einer Auflösung der Wachstumszone erzielt.

Selbst eine Konzentration von 2 mg : 500 ml Lösungsmittel war für Kardialmuskel-, Koronargefäß-, Leber-, Haut- und Os frontale-Explantate nach 6 Tagen Einwirkungszeit absolut zytotoxisch. Auch an Haut und Leber von einem humanen Foeten, mens 1 - 2, konnte nur ein mäßiges Zellwachstum eruiert werden.

Eine grundsätzlich andere Reaktion wurde mit der gleichen Konzentration erzielt. Sämtliche Testgewebe wie Kardialmuskel, Koronargefäße, Os frontale, Niere und Haut reagierten auf 1 Mikrotröpfchen mit einem großen Fächer von mitotischen Abläufen, von mäßig-gut, über gut, bis sehr gut.

Diskussion: D) Tetracyclin-kristallin. "ACHROMYCIN"-Lederle

Von diesem TETRACYCLIN-Derivat ist bekannt, daß es hauptsächlich bei Infektionen mit grampositiven und gramnegativen Erregern, bei Spirochäten-Infektion, bei Rickettsien, großen Virusarten und einigen Protozoen indiziert ist.

Wie alle Antibiotika vorher wurde es ebenfalls mit embryonalen Geweben und Zellen ausgetestet. Jeweils 1 gtt der Konzentrationen von 1 mg : 1 ml Lösungsmittel 0,5 mg : 1 ml und 0,25 mg : 1 ml wurden an epithelialen und apothelialen Geweben ausgetestet. 0,05 mg des Antibiotikums inhibierten bei Koronargefäß- und Darm-Explantaten vom 9 Tage alten Hühnerembryo die Zellproliferation sehr stark. 500 mg des Antibiotikums auf 50 ml Lösungsmittel erzeugten noch bei den Testgeweben eine geringe, aber zytotoxisch bedingte Inhibition. 5 mg : 1 ml inhibiert sehr stark.

Alle Tetracycline, auch Aureomycin und Achromycin, enthalten mehrere phenolische Hydroxylgruppen und geben daher mit Eisen-III-Chlorid eine rotbraune Farbreaktion, die auch bei unseren Kulturen auftrat. Diese Reaktion wird zur colorimetrischen Bestimmung der Tetracycline verwendet. (80)

Bei längerer Aufbewahrung von TETRACYCLIN ("ACHROMYCIN") in alkalischer Lösung bildet sich aus Tetracyclin neben Oxytetracyclin noch ein anderes Reaktionsprodukt, das aus stärkerem alkalischem Milieu als Isotetracyclin (12a-Desoxydesdimethylaminoisooxytetracyclin) hervorgeht.

Könnte nicht diese Verbindung toxisch auf die explantierten Gewebe und Zellen wirken?

Diskussion: E) METHACYCLINUM "RONDOMYCIN" - Mack

Die embryonalen Gewebe wurden mit folgenden Konzentrationen konfrontiert, je 1 gtt = 0,02 mg, 0,01 mg und 0,005 mg.

Diese Konzentrationen wurden mit der Haut eines Foeten vom Menschen, mens 4 - 5 , in Kultur konfrontiert. Schon bei 0,005 mg beginnt ein Prozeß der Stimulierung der Zellproliferation, der über eine gute Vermehrung bei 0,0025 mg/1 gtt zu einer Stimulierung der Zellvitalität bei 0,0012 mg/1 gtt führt.

Wurden embryonale Hautexplantate beim Huhn den gleichen Konzentrationen unterworfen, so ergaben sich bei der hohen Konzentration die gleichen Inhibitionerscheinungen und bei Abnahme der Konzentration ähnliche Stimulierungen der Zellvitalität.

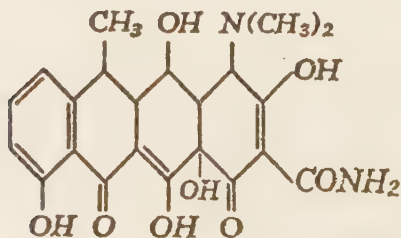
Methacyclin löst bei Ratten keine teratogenen Wirkungen aus. (81) Bestimmte Antibiotika zeigen eine Affinität zum intrazellulären Eiweiß, die größer ist als die zum Eiweiß des Blutplasmas, woraus sich bei therapeutischer Anwendung höhere Gewebs- als Serumspiegel ergeben können. Eine gewisse "Organspezifität" ließe sich daraus erklären. Eine besondere "Affinität des Methacyclins zur Lunge" besteht, wobei völlig offen bleibt, welche biochemischen Vorgänge dem hier übernommenen Begriff der "Gewebsaffinität" oder der sogenannten "Organspezifität" entsprechen. (82) Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die hohe Diffusionsfähigkeit des Methacyclins durch die epithelialen und endothelialen Barrieren in das Lungengewebe eruiert. Das Antibiotikum ist in allen Zellen des Lungenparenchyms zu finden. (83)

Diskussion: F) DOXYCYCLIN - "VIBRAMYCIN"-Pfizer

Haut vom Menschen reagiert auf hohe Wirkstoffkonzentrationen von Antibiotika genauso wie embryonale Haut vom 9 Tage alten Hühnerembryo mit einem profunden Mitose-stop. Eine Erhöhung der Dosis führt zu einer Aberration des morphologischen Zellbildes. Ein ähnliches Bild gab es mit der gleichen Konzentration an Os frontale- und Koro-nargefäß-Explantaten. An Geweben mit hoher Proliferations-rate das Abtropfen von einzelnen Zellen, bei Geweben mit geringer Mitoserate das typische Bild der gehemmten Zellmigration.

Auch embryonale Hühnerhaut-Explantate stellten bei diesen Konzentrationen ihre Vermehrung ein.

Lediglich eine Zugabe von 0,8  $\mu$ g führte an der embryonalen Haut zu einem weit gespannten Fächer von Reaktionen, die von der mäßig-guten bis zu einer starken, fast als stimuliert zu bezeichnenden, Zellproliferation reichten.  $\alpha$ -6-Desoxy-5-Hydrotetracyclin trägt die Kurzbezeichnung Doxycyclin und das Warenzeichen "Vibramycin".



F. 11. Strukturformel des "VIBRAMYCIN"

Es ist eine hellgelbe, kristalline Substanz mit der Summenformel  $C_{22}H_{24}N_2$  .

Vibramycin wird nach oraler Gabe sehr schnell und in hohem Maße resorbiert. Es übertrifft hierbei alle anderen Tetracycline. Im Organismus lassen sich sehr lang anhaltende, therapeutisch wirksame Konzentrationen nachweisen.

Vibramycin zeigt eine hohe Lipoid-Affinität, welche die der anderen Tetracycline um ein Mehrfaches übertrifft. Diese besondere Lipophilie trägt zur Erklärung der hohen Resorptionsgeschwindigkeit und der guten Aufnahme in den Geweben bei. (84)

Geringfügige Änderungen der Struktur führen häufig zu wichtigen Modifikationen im Verhalten der Tetracycline. Bei isolierten mit Blut versorgten Darmabschnitten findet die schnellste und intensivste Resorption des Doxycyclins im Duodenum statt. (85)

Die therapeutische Wirksamkeit eines Antibiotikums hängt weniger von seinem Serumspiegel ab als von seiner Fähigkeit in die Gewebe, vor allem in die entzündeten Gewebe, einzudringen. (86) Die Tetracycline dringen nicht nur in das Innere der Zellen. Das wurde klar gezeigt für Leukozyten und Erythrozyten (87) und für Makrophagen. (88)

Eindrucksvoll ist es, wie stark eine geringfügige Strukturänderung in erheblichem Maße das Verhalten der Tetracycline im Organismus beeinflussen kann. Doxycyclin, ein hydrogenisiertes Methacyclin, unterscheidet sich von den anderen Tetracyclinen durch seine Serumkonzentration, die während sehr langer Zeit auf hohen Werten bleibt. Doxycyclin wird innerhalb von 3 Tagen auf 3 verschiedenen Wegen fast vollständig aus dem Organismus eliminiert: 4/10 werden durch den Urin ausgeschieden, 1/20 durch die Fäkalien, der Rest - ungefähr 50 % - wird im Organismus und im besonderen im Darmtrakt in bakteriologisch inaktive Derivate umgebaut. (89)

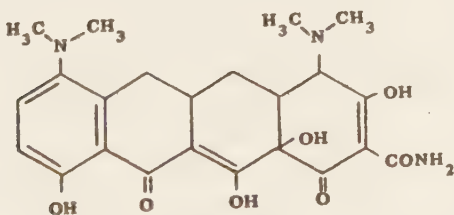
Die Tetracycline dringen nicht nur in die extrazellulären Flüssigkeiten der Organe ein, sondern in das Innere der Zellen. Das wurde für Leukozyten, Makrophagen und Erythrozyten klar gezeigt. Dieser Eigenschaft kommt eine beträchtliche Bedeutung zu, da sie den Tetracyclinen, hier besonders dem Doxycyclin, erlaubt, die in den Zellen befindlichen Mikroorganismen aufzuspüren und zu erreichen.

Gleichzeitig vermögen aber auch die Antibiotika in einen engen Kontakt mit den Zellorganellen, u.a. Mitochondrien, zu treten. (90)

Doxycyclin ("Vibramycin") wird nach oraler Gabe besser resorbiert und durchdringt die Gewebe in noch größerem Ausmaß als die anderen Tetracycline. Diese beiden Charakteristika sind wahrscheinlich die Folge einer erhöhten Lipophilie des Doxycyclins. Wie bei allen Tetracyclinen kommt es auch beim Doxycyclin nach gehäufte Verabreichung zu einer gewissen Kumulation der Serumkonzentrationen. (91)

Diskussion: G) MINOCYCLINUM - "KLINOMYCIN" - Lederle

Zum Abschluß der Versuche mit Tetracyclinen soll nun eines der neuesten Präparate auf diesem Sektor vorgestellt werden. Das "KLINOMYCIN" - Lederle = MINOCYCLINUM.



**Minocycline**

F. 12. Strukturformel des MINOCYCLIN

Mit verschiedenen Nährmedien wurde Epidermis eines menschlichen Foeten, mens 5, mit Minocyclin 2 mg : 10, 50 und 100 ml Lösungsmittel konfrontiert. Je Kultur 1 gtt. Die höchste Konzentration führte zur Inhibition, die mittlere zur mäßig-guten Proliferation, die dritte Verdünnung zu einer Stase der Zellvermehrung.

Unterschiedlich in der Wirkung waren die gleichen Dosen auf Kardialmuskel- und Leber-Explantate vom 9 Tage alten Hühnerembryo. Während die Resultate am Kardialmuskel denen der foetalen Haut entsprachen, reagierte die wesentlich empfindlichere Leber des Hühnerembryos mit einer Inhibition.

Haut vom 9 Tage alten Hühnerembryo mit den gleichen Konzentrationen behandelt, zeigte ein verändertes Bild.



Die höchste Konzentration führte zu einer gehemmten Rundzellproliferation, 2 mg/50 ml zu einer starken, ungehemmten Proliferation, 2 mg/100 ml zu einer sehr starken, fast stimulierten, Zellvermehrung.

Ein weiterer Ansatz mit Haut vom 12 Tage alten Hühnerembryo mit den gleichen Konzentrationen ergab nur Inhibition, Stase und das Zellbild einer überwundenen Stase. Magen-Explantate reagieren als Epithelfragmente mit einer mäßig-gehemmten, kleinzelligen Proliferation bis zur guten Zellvermehrung.

Os frontale und Epidermis (12 Tage) reagieren auf 0,02 mg pro gtt mit einer vollständigen profunden Inhibition.

1 gtt mit 0,01 mg MINOCYCLIN (MCN) wurde mit Explantaten der Epidermis und der Milz konfrontiert. Bei der Epidermis reichte die Zellproliferation von der Inhibition bis zum Hervorwachen einzelner Epithelspitzen, während das Milzgewebe vollständig inhibiert wurde.

Epidermis vom menschlichen Foeten, mens 4, erhielt zum Kulturmedium 1 gtt einer Lösung von 2 mg MCN : 200 ml, 300 ml und 400 ml Lösungsmittel. Sämtliche Konzentrationen hemmten mit unterschiedlicher Stärke das Wachstum.

2 mg MCN : 500 ml Lösungsmittel, pro 1 gtt = 0,0008 mg inhibiert bei Haut-, Koronargefäß- und Os frontale-Explantaten die Mitose. Sogar eine Verdünnung von 2 mg : 1 000 ml läßt noch eine inhibierende Wirkung deutlich erkennen.

Diese Konzentrationsstufe wirkt bei Bindegeweben und Epithelien sehr unterschiedlich. Die Epithelien der embryonalen Gallenblase und der Nieren zeigen eine mäßige bis mäßig-gehemmte Zellvitalität, während die Bindegewebe- und Knochengewebs-Explantate der Koronargefäße und des Os frontale starke, ungehemmte Proliferationen aufweisen. 2 mg MCN : 500 ml Lösungsmittel inhibieren die Zellproliferation der embryonalen Haut vollständig.

Lunge (16 Tg) reagiert auf 1 gtt der jeweiligen Lösung von 2 mg MCN : 200, 300 und 400 ml Lösungsmittel mit einer Inhibition, die über eine Zytostase bis zu einer stark gehemmten Proliferation reicht. Auch die Trachea-Explantate zeigten nur ein geringes Wachstum.

Lunge (14 Tg) erhielt 1 gtt einer Lösung von 2 mg MCN: 1 000 ml Lösungsmittel. Das Resultat war nach 4 Tagen Kultur eine gute Zellproliferation, die eine anfängliche Konfrontationsstase vollständig überwunden hatte.

Lunge (12 Tg) erhielt 1 gtt der gleichen Lösung. Auch hier konnte am Zellbild festgehalten werden, daß eine anfängliche Stase durch eine hohe Mitosepotenz überwunden wurde.

In die Therapie wurde als neuestes TETRACYCLIN-Derivat das MINOCYCLIN (MCN) als Präparat KLINOMYCIN<sup>R</sup> eingeführt. Dieses neue Derivat wurde von mir, bevor es in die Therapie übernommen wurde, auf seine Wirkung auf embryonale tierische und menschliche Zellen in vitro geprüft.

Aus den Untersuchungen ist abzuleiten, daß sich in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml Nährmedium in der Kultur von foetaler Epidermis, Kardialmuskel, Os frontale, Leber- und Lungenexplantaten von 12 Tage alten Hühnerembryonen eine mäßig gehemmte Zellproliferation zu eruieren war.

Auch bei Magenexplantaten (12 Tg) wurde in der gleichen Konzentration ein Übergang einer mäßig inhibierten Proliferation bis zur Kombination mit einer progressiven Proteolyse beobachtet. Gleichartige Ergebnisse zeigten sich bei Lungenkulturen (12 Tg) bei einer Konzentration um 0,1 µg/ml, wobei ebenfalls eine Lyse in der Wachstumszone auffällig war. Aus diesen Versuchsreihen läßt sich ableiten, daß bei den angewandten Dosis-Zeit-Beziehungen mit anderen Antibiotika vergleichbare Wirkungen auf die Gewebekulturen zu erzielen sind, wie es ja auch hier festgestellt wurde. (92)

MINOCYCLIN, 7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline ist eine neue TETRACYCLIN-Verbindung, die besonders durch ihre Fähigkeit, resistente Staphylococcen zu inaktivieren, bekannt geworden ist. (93)

Prüfungen der akuten, subakuten und chronischen Toxizität bei Ratten, Mäusen und Hunden ergaben, daß MCN nur über eine sehr geringe Toxizität verfügt.

MINOCYCLIN, 7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracyclin, ist ein neues Derivat der Tetracyclin-Familie. (94) Minocyclin wird in auffallend niedriger Konzentration, jedenfalls als aktive Substanz im Urin ausgeschieden. Eine Inaktivierung und Metabolisierung im Organismus dürfte von größter Bedeutung sein; sie wird auf über 60 % geschätzt. Genaueres über Natur und Schicksal dieser Metaboliten ist ähnlich wie bei den anderen Antibiotika nicht bekannt.

Da bei allen Tetracyclinen hohe Gallenkonzentrationen zu beobachten sind, findet ein großer Teil der Inaktivierung im Darm statt. (95)

In der Gewebekultur wurde die Wirkung des Minocyclins auf embryonale tierische und menschliche Zellen in vitro geprüft. Diese Untersuchungen werden von dem Autor an der Hautklinik der Freien Universität routinemäßig durchgeführt, und es wird versucht, eine Basis für die Deutung therapeutischer Resultate zu erhalten.

Aus den Untersuchungen ist abzuleiten, daß sich in einer Endkonzentration von 0,4  $\mu\text{g/ml}$  in der Kultur foetaler Epidermis und embryonaler Epidermis, Kardialmuskel und Leberexplantaten von Hühnerembryonen eine mäßig gehemmte Zellproliferation darstellte.

Auch bei Magenexplantaten vom 12 Tage alten Hühnerembryo wurde mit der gleichen Konzentration ein Übergang von einer mäßig inhibierten Proliferation bis zur Kombination mit einer Zytolyse beobachtet. Gleichartige Ergebnisse zeigten sich bei Lungenkulturen von 12 Tage alten Hühnerembryonen bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ,

wobei eine allgemeine Lyse der Wachstumszone auffällig war.

Aus den bisherigen Versuchsreihen läßt sich ableiten, daß bei den angewandten Dosis-Zeit-Beziehungen mit anderen Antibiotika vergleichbare Wirkungen auf die Gewebeskulturen zu erzielen waren, wie es in den Untersuchungen bewiesen wurde. (96)

Die einzelnen Derivate der Tetracyclin-Gruppe weisen hinsichtlich ihrer chemischen Verwandtschaft ein gleichartiges breites Wirkungsspektrum auf. Nur in den Seitenketten unterscheiden sich Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Methacyclin, Rolitetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin voneinander. (97)

Minocyclin, ein neues Mitglied der Tetracyclin-Gruppe, besitzt eine sehr hoch-schwellige Aktivität gegen Tetracyclin-resistente Staphylococcen. Beim Menschen hat es eine biologische Halbwertszeit, die dem des Doxycyclin nahe kommt, aber wahrscheinlich länger ist als bei den anderen Tetracyclinen. Es erscheint schnell<sup>er</sup> als Doxycyclin, Demethylchlortetracyclin und Methacyclin absorbiert zu werden.

Niedrigere Werte für die renale Clearance wurden bei Minocyclin, aber nicht bei den anderen Tetracyclinen gefunden. Minocyclin wird stärker biologisch transformiert als die anderen Tetracycline und hat größere lipophile Eigenschaften als diese. (98)

Literaturverzeichnis : Diskussion 1) TETRACYCLINE

- (1) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen. F.K.Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 1971
- (2) FRANKLIN, T.J.  
and SNOW, G.A. : Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973
- (3) SALLE, A.J.  
and AMESUR, B.R. : Evaluation of germicidal efficiencies of a group of antibiotics tested by tissue culture technic.  
Proc.Soc.exp. Biol.Med.93, 67-69 (1956)
- (4) LIVINGGOOD, C.S.  
and FUNAN HU : Tissue culture of human skin and chick spleen as a method for evaluating the primary irritant producing capacity for topical medicaments, correlation of results with clinical observations. Ann.N.Y.Acad.Sci.58, 1202-1209 (1954)
- (5) HU, F,  
LIVINGGOOD, C.S.  
JOHNSON, P.  
and POMERAT, C.M. : Tissue culture studies on human skin. IV. The comparative toxic effects of antibiotics on tissue culture explants of human skin and embryonic chick spleen. J.invest.Derm.20, 357-372 (1953)
- (6) FEGELER, F. : Toxische, allergische und biologische Nebenwirkungen der Antibiotikatherapie. Acta dermat-vener. Proc. 11th Intern.Congr.Dermatology, vol.III pp.128-132
- (7) METZGER, J.F.  
FUSILLO, M.H.  
CORNMAN, I.  
and KUHN, D.M. : Antibiotics in tissue culture.  
Exp.Cell Res.6, 337-344 (1954)

- (8) ALLEN, E.G. Distribution and persistence of  
GIRARDI, A.J. Aureomycin in the chick embryo.  
SIGEL, M.M. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 542-543  
and KLEIN, M. : (1953)
- (9) PARK, J.K. : The uptake of tetracycline by human  
blood cells. Brit. J. Pharmacol.  
36, 180-181 (1969)
- (10) MAXWELL, I.H. : Studies of the binding of tetra-  
cyclines to ribosomes in vitro.  
Molecular Pharmacol. 4, 25-37 (1968)
- (11) KLIMOVA, N.E. : Study on absorption and distribution  
of Erythromycin, Oleandomycin, Tetra-  
cycline and Oletetrin on experimental  
model of chick embryo.  
Antibiotiki 12, 1078-1082 (1967)
- (12) MAIROVA, V.A. : Penetration of tetracycline antibi-  
otics into macrophages in vivo.  
Antibiotiki 12, 500-503 (1967)
- (13) BRAUDE, A.I. Elimination of side effect of tetra-  
and SHEVNYUK, L.A.: cycline high doses on intestine epi-  
thelium with methyluracil (methacyl).  
Antibiotiki 14, 37-40 (1969)
- (13a) BRAUDE, A.I. Prevention of side effect of some  
and SCHERBAKOVA, E.G.: antibiotics on tissue cells with  
4-methyluracil. Antibiotiki 12,  
333-338 (1967)
- (14) ZAK, A.F. : A study on biological activity of  
tetracyclines using tissue cultures.  
Antibiotiki 11, 698-705 (1966)

- (15) PROCHAZKA, Z.                      The influence of chlortetracycline  
RODAK, L.                              on the immunological reactivity of  
and KREJCI, J.                        : chickens. Folia Microbiol. 13,  
490-494 (1968)
- (16) OISHI, Y.                            : Effects of antibiotics and chemo-  
therapeutics on the growth of fibro-  
blasts from chick embryo heart in  
the simplified replicate tissue  
culture. II. Jap. J. Exp. Med. 26,  
161-171 (1956)
- (17) JOURNEY, L. J.                      The effect of terramycin on the fine  
and GOLDSTEIN, M. N. : structure of HeLa cell mitochondria.  
Cancer Res. 23, 551-554 (1963)
- (18) LEPINE, D.                            Action of chloromycetin and of  
BARSKI, G.                              aureomycin on normal tissue cultures.  
and MAURIN, J.                        : Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 252-255  
(1950)
- (19) MILCH, R. A.                        Bone localization of the tetra-  
RALL, D. P.                              cyclines.  
and TOBIE, J. E.                        : J. Nat. Cancer Inst. 19, 87-93 (1957)
- (20) gleiche Autoren wie (18)
- (21) VAN METER, J. C.                      Effect of aureomycin on the respira-  
and OLESON, J. J.                        : tion of normal rat liver homogeni-  
tes. Science 113, 273 + (1951)
- (22) LOOMIS, W. F.                        : On the mechanism of action of aureo-  
mycin. Science 11, 474 + (1950)
- (23) VAN METER, J. C.                      In vitro action of Aureomycin on  
SPECTOR, A.                              oxidative phosphorylation in animal  
and OLESON, J. J. : tissue. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81,  
215-217 (1952)







- (40) SALLE, A. J. and AMESUR, B. R. : Evaluation of germicidal efficiencies of a group of antibiotics tested by tissue culture technic. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 93, 67-69 (1956)
- (41) OSTERTAG, W. : Chemische Mutagenese an menschlichen Zellen in Kultur. Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Abh. Math.-Naturwissensch. Klasse Jg. 1966, Nr. 1
- (42) BRODY, T. M. HURWITZ, R. and BAIN, J. A. : Magnesium and the effect of the tetracycline antibiotics on oxidative processes in mitochondria. Antibiot. Chemother. 4, 864-870 (1954)
- (43) DuBUIY, H. G. and SHOWACRE, J. L. : Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells. Science 133, 196-197 (1961)
- (44) LOOMIS, W. F. : On the mechanism of action of aureomycin. Science 111, 474 + (1950)
- (45) JOURNEY, L. J. and GOLDSTEIN, M. N. : The effect of terramycin on the fine structure of HeLa cell mitochondria. Cancer Res. 23, 551-554 (1963)
- (46) LEPINE, P. BARSKI, G. and MAURIN, J. : Action of chloromycetin and of aureomycin on normal tissue cultures. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 252-255 (1950)
- (47) CHANG, T. W. and WEINSTEIN, L. : Photosensitization of human cell cultures by demethylchlortetracycline. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 116, 509-512 (1964)

- (48) NEU, R. Effect of antibiotics on chromo-  
 ASPILLAGA, M. J. somes of cultured human leukocytes.  
 and GARDNER, L. I. : Nature 205, 171-172 (1965)
- (49) SUMM, H. D. Untersuchungen über den Wirkungs-  
 und CHRIST, O. : mechanismus der Tetracycline am  
 Modell der zellfreien Protein-Bio-  
 synthese.  
 Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17,  
 1186-1189 (1964)
- (50) BURCHALL, J. J. Antibacterial chemotherapy.  
 FERONE, R. Ann. Rev. Pharmacol. 5, 53-76 (1965)  
 and HITCHINGS, G. H. :
- (51) DAMJANOV, I. Ultrastructure of acute tetracycline  
 and SOLTNER, D. : induced liver change.  
 Experientia 27, 1204-1205 (1971)
- (52) BEVELANDER, G. The effect of tetracycline on the  
 NAKAHARA, H. development of the skeletal system  
 and ROLLE, G. K. : of the chick embryo.  
 Developm. Biol. 2, 298-312 (1960)
- (53) ZUCKERMAN, A. J. The effect of tetracycline on human  
 BAKER, S. F. liver cells in culture.  
 and DUNKLEY, L. J. : Brit. J. exp. Path. 49, 20-23 (1968)
- (54) METZGER, J. F. Antibiotics in tissue culture.  
 FUSILLO, M. H. Exp. Cell Res. 6, 337-344 (1954)  
 CORNMAN, I.  
 and KUHNS, D. M. :
- (55) CHERNUKH, A. M. The effect of some drugs on embryo-  
 and ALEKSANDROV, P. N. : genesis and mitosis. Patol. Fiziol.  
 Eksperim. Terapiya 9, 41-44 (1965)

- (56) ZAK, A.F. : A study on biological activity of tetracyclines using tissue cultures. Antibiotiki 11, 698-705 (1966)
- (57) ZUCKERMAN, A.J. The effect of tetracycline on human  
BAKER, S.F. liver cells in culture.  
and DUNKLEY, L.J.: Brit. J. exp. Path. 49, 20-23 (1968)
- (58) SAXEN, L. : Tetracycline : Effect on osteogenesis in vitro. Science 149, 870-872 (1965)
- (59) VONDERBANK, H. : Aureomycin und Achromycin. Klinische Wirkung und deren experimentelle Grundlagen. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 6. Beiheft, pp. 12-16 (1956)
- (60) DuBUY, H.G. Selective localization of tetracycline in mitochondria of living  
and SHOWACRE, J.L.: cells. Science 133, 196-197 (1961)
- (61) DuBUY, H.G. Tetracycline fluorescence in permeability studies of membrane  
RILEY, F. around intracellular parasites.  
and SHOWACRE, J.L.: Science 145, 163-165 (1964)
- (62) siehe (59)
- (63) ETTLINGER, L. : Wirkungsmechanismus der Antibiotica. Antibiotica et Chemother. 4, 46-68 (1957)
- (64) HOBUSCH, D. : Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten des exokrinen Pankreas unter Antibiotikamedikation. Ber. Tag. Ges. Pathologie DDR, Zbl. allg. Path. 113, 268-281 (1970)
- (65) siehe (53)

- (66) VAS, M.R. Effects of erythromycin and  
BAIN, B. tetracycline in human bone-  
and LOWENSTEIN, L. : marrow cultures.  
Nature (Lond.) 204, 1100-1101  
(1964)
- (67) JACOBS, R. The interaction between tetra-  
HARRIS, W.H. cycline and reconstituted  
KATZ, E.P. guinea-pig-skin collagen, in  
and GLIMCHER, M.J. : vitro. Biochim. Biophys. Acta  
86, 579-587 (1964)
- (68) LACKO, I. The interactions of antibiotics  
KORINEK, J. of the tetracycline type with  
and BURGER, M. : serum protein.  
Clin. chim. Acta (Amst.) 4,  
800-806 (1959)
- (69) NIKOLOV, T.K. Influence des antibiotiques  
STANTCHEV, B.D. sur la formation des anticorps  
et BOYADJIEV, S.I. : in vitro. I. Etude comparée de  
l'influence inhibitrice des  
tetracyclines et du chlor-  
amphenicol.  
Ann. Inst. Pasteur (Suppl. 3) 110,  
181-185 (1971)
- (70) BRÜGGEMANN, J. Bilanzstudien mit C<sup>14</sup>-Chlor-  
MERKENSCHLAGER, M. tetracyclin an der Legehenne  
und NIESAR, K.-H. : unter den Bedingungen der Anti-  
biotikafütterung.  
Zbl. f. Veterinärmedizin, Reihe B,  
10, 631-648 (1963)
- (71) MILCH, R.A. Bone localization of the tetra-  
RALL, D.P. cyclines.  
and TOBIE, J.E. : J. Nat. Cancer Inst. 19, 87-93 (1957)

- (71a) MILCH, R.A. Fluorescence of tetracycline  
 RALL, D.P. antibiotics in bone.  
 and TOBIE, J.E. : J.Bone Joint Surg.40-A,897 (1958)
- (72) BUESKE, D.A. Concentration and persistence  
 EISNER, H.J. of tetracycline and chlortetra-  
 and KELLY, R.G. : cycline in bone.  
 J.Pharmac.Exp.Therap.130,  
 150-156 (1960)
- (73) POWIS, G. : A study of the interaction of  
 tetracycline with human serum  
 lipoproteins and albumin.  
 J.Pharm.Pharmacol.26,113-118  
 (1974)
- (74) VAS, M.R. Effects of erythromycin and  
 BAIN, B. tetracycline in human bone-  
 and LOWENSTEIN, L. : marrow cultures.  
 Nature 204,pp.1100-1101 (1964)
- (75) ZAK, A.F. : A study on biological activity  
 of tetracycline using tissue  
 cultures.  
 Antibiotiki 11,698-705 (1966)
- (76) EGER, W. Untersuchungen über die Wirkung  
 und ILBAGIAN, K. : von Tetracyclinen auf die Leber.  
 Arzneim.-Forsch.(Drug Res.) 12,  
 285-289 (1962)
- (77) VERWEY, W.F. Penetration of chemotherapeutic  
 WILLIAMS jr., H.R. agents into tissues.  
 and KALSDW, C. : Antimicrob.Ag.Chemother. Am.Soc.  
 Microbiol.pp.1016-1024 (1965/66)
- (78) KESSEL, R.W.I. : Penetration of chemotherapeutic  
 agents into cells.  
 Antimicrob.Ag.Chemother.Am.Soc.  
 microbiol.pp.1035-1043 (1965/66)



- (79) COLLINS, J.F. : Antibiotics, proteins and nucleic acids.  
Brit. Med. Bull. 21, 223-228 (1965)
- (80) VONDERBANK, H. : Aureomycin und Achromycin. Klinische Wirkung und deren experimentelle Grundlagen.  
Arzneim.-Forsch. 6. Beiheft (1956)
- (81) ELL, O. : Erfahrungen mit einem halbsynthetischen Tetracyclin (Rondomycin).  
und SCHUBERT, R. : Münchn. med. Wschr. 108, 2165-2171 (1966)
- (82) POLZ, E. : Besondere " Lungenaffinität "  
und SCHMIEDEL, A. : von Methacyclin ?  
Münchn. med. Wschr. 110, 1651-1653 (1968)
- (83) BONONI, L.J. : Diffusion of 6-Methylene-5-hydroxy  
and JORI, E. : -tetracycline in pulmonar tissue  
and lymph.  
Antibiotica 3, 51-66 (1965)
- (84) DIMMLING, Th. : Bakteriologische Untersuchungen  
über Resorption und Exkretion  
sowie über das Wirkungsspektrum  
von Alpha-6-Desoxyoxytetracyclin  
(Doxycyclin).  
Med. Klin. 62, 1269-1276 (1967)
- (85) PINDELL, M.H. : Absorption and excretion studies  
CULL, K.M. : on tetracyclines.  
DORAN, K.M. : J. Pharmacol. exp. Ther. 125, 287-294  
and DICKISON, H.L. : (1959)

- (86) FABRE, J. Die Kinetik der Tetracycline  
MILEK, E. beim Menschen unter besonderer  
KALFOPOULOS, P. Berücksichtigung von Doxycyclin  
und MERIER, G. : (Vibramycin<sup>(R)</sup> Pfizer).  
Schweiz.med.Wschr.101,593-598;  
625-633 (1971)
- (87) DRESSLER, J. A study of in vitro incorporation  
und MACH, P. : of tetracycline antibiotics into  
avian and mammalian blood cells.  
Folia haematol.84,368 (1965)  
- 374
- (88) EKZEMPLYAROV, O.N. : Penetration of tetracycline and  
streptomycin into macrophage  
cultured in vitro.  
Antibiotiki 10,435-427 (1965)
- (89) FABRE, J. Verteilung und Ausscheidung von  
PITTON, J.S. Doxycyclin beim Menschen.  
und KUNZ, J.P. : Chemotherapia 11,73-85 (1966)
- (90) FABRE, J. Die Kinetik der Tetracycline  
MILEK, E. beim Menschen unter besonderer  
KALFOPOULOS, P. Berücksichtigung von Doxycyclin  
und MERIER, G. : (Vibramycin<sup>(R)</sup> Pfizer).  
Schweiz.Med.Wschr.101,593-598;  
625-633 (1971)
- (91) MIGLIARDI, J.R. Pharmakokinetische Eigenschaften  
und SCHACH von von Doxycyclin beim Menschen.  
WITTENAU, M. : 5.Intern.Kongreß f.Chemotherapie,  
Wien 26.6.-1,7.1967.
- (92) LIPP, R. : Persönliche Mitteilung.  
In LAUSCHNER, E. und STÜTTGEN, G.:  
Minocyclin-Symposium, Bad Reichen-  
hall, Juli 1971. G.Thieme-Verlag,  
Stuttgart 1972, p.50-51
- (93) FEDORKO, J. In vitro activity of Minocyclin.  
KATZ, S. A new tetracycline.  
and ALLNOCH, H. : Am.J.Med.Sci.255,252-258 (1968)

- (94) KNOTHE, H. : Die mikrobiologische Aktivität von Minocyclin im Vergleich zu anderen Tetracyclinen. In LAUSCHNER, E. und STÜTTGEN, G.: Minocyclin-Symposium Bad Reichenhall, Juli 1971. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972, p.16-24.
- (95) LANG, W. : Die Pharmakokinetik des Minocyclins. Minocyclin-Symposium, Bad Reichenhall Juli 1971, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1972, p.27-33.
- (96) LIPP, R. : Persönliche Mitteilung. In LAUSCHNER, E. und STÜTTGEN, G. Minocyclin-Symposium, Bad Reichenhall Juli 1971, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972, pp. 50-51
- (97) SCHMID, W. : Die mikrobiologische in vitro-Aktivität von Minocyclin im Vergleich zu anderen Tetracyclinen und zu zwei klinisch bedeutenden Penicillinen, Ampicillin und Carbenicillin. Med. Welt 24, 2073-2074 (1973).
- (98) MACDONALD, H. : Pharmakokinetic studies on minocyclin in man.  
KELLY, R. G.  
ALLEN, St. E. Clin. Pharmacol. Ther. 14, 852-861 (1973)  
NOBLE, J. F.  
and KANEGIS, L. A.:

Diskussion 2: Wie kann man sich den Metabolismus der Antibiotika in der tierischen Zelle in Kultur vorstellen?

Experimentelle Untersuchungen an Gewebekulturen können außer für zellbiologische Fragestellungen auch für mannigfaltige Fragen der Physiologie und Biochemie wertvolle Ergebnisse beitragen. Solche Untersuchungen haben den Vorzug, daß das Objekt des Versuches lebendig ist.

Substantielle Einwirkungen äußern sich an der Zelle durch Stimulation oder durch Inhibition. Zwischen den Zellen in Kultur und dem sie umgebenden Medium spielen sich sehr wichtige vitale Prozesse ähnlich denen im Organismus ab. Im Medium findet Stoffaustausch statt. Jede Kultur besteht aus zwei Teilen unterschiedlichen Charakters, aus dem Explantat und der Wachstumszone mit neugebildeten Formationen. Das Wachstum in Kultur gestaltet sich in folgender Art und Weise:

Von dem explantierten Fragment entwickeln sich mit starker Regelmäßigkeit, Dichte und Intensität in den umgebenden Nährboden hinein Zellen und Gewebe, die einen Zellschleier bilden = die Wachstumszone. Zwei Vorgänge bestimmen diese Art der Ausbreitung: Die Zellmigration und Zellproliferation. Eine Latenzzeit, die vom Beginn der Explantation bis zum Einsetzen der Migration und Proliferation reicht, ist bei einzelnen spezifischen Zellformen unterschiedlich und von vielen Faktoren abhängig.

Eine große Anzahl von Forschern hat die Gewebekulturen dazu benutzt, um Zellteilungsgifte und zellteilungswirksame Substanzen verschiedenster Art zu prüfen. Im Zustand der Mitose ist die Zelle physikalischen und chemischen Einwirkungen gegenüber wesentlich empfindlicher als eine Ruhezelle der intermitotischen Phase.

Auch die hier vorgelegten Untersuchungen sollten die Zellteilungswirksamkeit der Antibiotika hervorheben. -

## Antibiotika und ihre Zellwirksamkeit

Der Vorteil der Gewebekultur in der Analyse der Antibiotika-Wirkung ist klar, denn es ist eine Methode zur Untersuchung des direkten Effektes der Substanzen auf Zellen und Gewebe in Abwesenheit des komplexen Metabolismus des ganzen tierischen oder menschlichen Organismus.

Vom zellulär-pharmakologischen Standpunkt ist die Erhaltung von normalen Funktionen von größter Wichtigkeit. Deshalb werden hier nur Primokulturen mit der Testsubstanz konfrontiert, weil viele Eigenschaften in folgenden Subkulturen verloren gehen könnten. Daher ist die Beibehaltung der normalen Funktion von grundlegendem Wert.

Der Metabolismus der Antibiotika kann nach den hier vorgelegten Experimenten bei den Zellen und Geweben in Kultur anders ablaufen als im Organismus. Ausgehend von der Tatsache, daß im Organismus ein ständiger Strom von zu- und ableitenden Funktionen besteht, der zugeführte Substanzen sofort abbaut, verdünnt und ausschwemmt, so ist in der Kultur und hier besonders in der Deckglas-Kultur-Methode "im hängenden Tropfen" ein ganz anderer Mechanismus zu beobachten.

Die Testsubstanzen - hier die Antibiotika - werden der Fibrin-Thrombin-Komponente vor der Koagulation hinzugefügt und in dieses Gemisch inkorporiert. Nach der Koagulation treten die Testsubstanzen sofort mit den offenen Schnittkanten des Explantats in Kontakt. Sie dringen in das Gewebe ein, besonders in die Interzellularräume und entfalten von dort ihre Aggression auf die Zellen und die Zellorganellen. Die Resultate dieser Aggression nach erfolgter Konfrontation ist dann innerhalb der nächsten 12, 24, 48 oder 72 Stunden an der zellmorphologischen Reaktion der schnittkantennahen Gewebe und emigrierten Zellen offensichtlich.

Die einzelnen metabolischen Schritte kann man vielleicht so erklären: Durch aktive Transport-Prozesse der Zelle, durch Pinozytose und Phagozytose, werden die Antibiotika von der Zelle aufgenommen. Aber diese Formen des Stofftransportes sind von Umgebungsfaktoren, von der Gestalt, Größe und Form der Moleküle und der Verteilung von positiven und negativen Ladungen auf dem Molekül und auf der Zelloberfläche abhängig. Die Art der Passage differiert bei den verschiedenen Zellen. Die einfache Ionendiffusion ist abhängig von der Natur der Zelloberfläche.

Dieses wichtige Merkmal zellulärer Aktivität, die Pinozytose, wurde an Fibroblastenkulturen entdeckt. (1) Sie äußert sich in einem Eindringen der Zelloberfläche der Fibroblasten und der Bildung von Intrazellulär-Vakuolen. Damit wurde festgestellt, daß der Prozeß der Pinozytose ein ähnlicher zellulärer Prozeß wäre wie die Phagozytose. Zu diesen zellulären Mechanismen kann man auch die Organellen-Art der Lysosomen rechnen, die auf ihre Weise dazu beitragen, vorwiegend nicht diffundables Material von außen aufzunehmen. Die Lysosomen produzieren vorwiegend abbauende Enzyme (Hydrolasen). Das in das Zellinnere gelangte Material wird in einer Vakuole isoliert. (2) Diese Enzyme dienen teils der intrazellulären Verdauung von phagozytiertem oder pinozytiertem Material, teils dem physiologischen Abbau von Zellbestandteilen.

Bestünde nicht hier auch die Möglichkeit, daß die in den Lysosomen enthaltenen Enzyme durch die Aggression eines Antibiotikums = Störung der Membranstruktur, zur explosionsartigen Freisetzung der gespeicherten Enzyme führt, die sich dann in einer pathologischen Veränderung der Zellmorphie äußert. (3)

Über den Metabolismus des Penicillins beim Menschen ist bekannt, daß im Harn neben unverändertem Penicillin, 6-Amino-penicillinsäure, Penicillinsäure und  $\beta$ -Hydroxybenzyl-Penicillin nachgewiesen werden kann. (4)

Die Kultur von embryonalen Geweben, besonders vermittels der Plasma-Clot-Technik, verhindert aber eine weitreichende Ausschwemmung der Metaboliten aus den Geweben, so daß eine intensive Durchdringung der Zellen, embryonale Zellen sind besonders empfindlich gegen Änderungen in ihrem engsten Milieu, besteht. Die Derivate verbleiben 3 - 4 Tage in den Zellen der Gewebe und dem alles umschließenden Medium, erst dann erfolgt ein begrenzter Austausch während der Auswaschung beim Umsetzen der Kulturen in ein neues Medium. Durch die geringe BRAUNsche Molekularbewegung der Zellen werden die Derivate, die auch toxische Einflüsse ausüben, von Zelle zu Zelle getragen. Dieser interne, begrenzte Strom sorgt für eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der inhibierenden Substanz. Diese dürfte wohl als Hauptgrund für die unterschiedlichen Ergebnisse von Antibiotika-Testungen in Kultur und Organismus anzusehen sein.

Zu den gleichen Ergebnissen zwischen kristallinem PENICILLIN und humanen Plasmaproteinen kamen andere Autoren.  
(6)

Beim Hühnerserum dürfte ein ähnlicher Vorgang wie beim Humanserum ablaufen. (5, 6)

PENICILLIN G wird bis zu 58 % an die Proteine gebunden.

(7) Zumindest an den offenen Gewebeflanken der explantierten Gewebe bestünde die Möglichkeit einer Interaktion zwischen Antibiotikum und Proteinen des Gewebes und des Mediums. Für die vorliegenden Untersuchungen könnte man folgenden Schluß daraus ziehen:

Die dotierten PENICILLIN-Mengen gehen mit dem Hühner-Albumin, einem Plasma-Protein des Huhns, enthalten im Explantat und im Medium der Kultur, eine feste Bindung ein, die der ähnelt, die man auch als "penicillin-binding-component" (PBC) bezeichnet. Diese Komponente könnte auch mit den Lipoproteinen der kultivierten Zellen verbunden sein, wie sie sonst mit der Zellwand der Bakterien eine feste Bindung eingeht. (8) Neben der Exkre-



tion des PENICILLINS im Organismus werden vom PENICILLIN G, nach neueren Untersuchungen, bis zu 65 % an das Protein gebunden. (9) PENICILLIN ist für den Menschen nicht toxisch, aber unter bestimmten Umständen schädlich für Zellen und Gewebe in Kultur. (10)

Die Bindung der Antibiotika - hier des PENICILLIN - an das Hühner-Serum-Eiweiß ist ein reversibler Vorgang. Es besteht zwischen dem Eiweiß und dem freien Antibiotikum einerseits und dem eiweißgebundenen Antibiotikum andererseits ein Gleichgewicht, das das Ergebnis zweier Reaktionen darstellt. Das Antibiotikum hat die Neigung, sich an das Eiweiß zu binden, und andererseits besteht die Neigung dieser Bindung zu zerfallen. Die Bindung bedeutet nicht Inaktivierung, sondern nur zeitweise Immobilisierung von Antibiotikamolekülen. Das Ausmaß der Bindung ist abhängig vom Antibiotikum selbst, aber auch von der Dosis. (14)

Für den Metabolismus in Kultur kann man, angelehnt an ähnliche Untersuchungen über den Mechanismus der Penicillin-Wirkung am Mikroorganismus, folgende Reaktionsmöglichkeiten aufstellen: Das Antibiotikum kann

- 1) auf die Zellwand einwirken, um seine Permeabilität zu ändern, oder um eine Lyse hervorzurufen, oder durch Erhöhung destruktiver Mechanismen zu einem Zerfall der Zelle beizutragen.
- 2) auf einen oder mehrere enzymatische Prozesse wirken, um den Metabolismus im Hinblick auf die Absorption, die Respiration, auf die Energie-Utilisation, auf genetische Synthesen, strukturelle oder metabolische Komponenten, auf Entgiftungsvorgänge, auf das Gleichgewicht zwischen den Enzymen, den Metaboliten und ihren Derivaten.
- 3) auf den Anstieg oder die Ansammlung von lebenden Substanzen.
- 4) auf reproduktive Prozesse.

- 5) auf Prozesse der Elimination, denn eine eigentliche Exkretion ist in Kultur nur sehr begrenzt möglich.
- 6) auf Sensitivitäts-Mechanismen, die vergrößernd oder vermindernd wirken.
- 7) auf Austausch-Prozesse Einfluß nehmen.

Oberflächenaktive Antibiotika reduzieren die Oberflächenspannung und rufen eine Zytolyse hervor, aber eine Erklärung für diese Handlungsweise liegt nicht vor.

Für das PENICILLIN in der Gewebekultur könnte man einige oder alle dieser Punkte mit voller Überzeugung und nach Durchsicht der vorliegenden Untersuchungen bejahen. (11)

In Kultur findet im Gegensatz zum Organismus aber keine durchgreifende Inaktivierung oder Ausschwemmung von Metaboliten statt. Im Gegenteil - sie kreisen ständig im Medium und werden so dauernd mit den Zellen konfrontiert. Das könnte der Beginn eines Dauerzustandes einer Überlastung mit Metaboliten sein, der schließlich zu einer toxischen Auswirkung Anlaß gibt.

Die Meinung von PARK und STROMINGER (12), daß tierische Zellen für die PENICILLIN-Wirkung immun wären, da sie keine den Bakterien ähnliche Zellwand (cell wall) besäßen, kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, die tierische Zelle wird auch durch PENICILLIN beeinflusst, aber ganz anders als bei Bakterien-Zellen. Entweder sie wird durch geringe Konzentrationen in ihrer Zellproliferation stimuliert oder mit Zunahme der Konzentration pathologisch beeinflusst, so daß ihre Reaktion auf die toxisch wirksame Substanz von einer Zytostase bis zu einer Inhibition jeglicher Zellfunktionen reicht, deren Folge dann eine vollständige Nekrose infolge des Erlöschens sämtlicher Funktionen darstellt.

Konzentration ist ein ungeheuer wichtiger Faktor, das konnte bei diesen Untersuchungen über den nicht-medizinischen Gebrauch der Antibiotika festgestellt werden.

Die Arbeit mit Gewebekulturen indiziert, daß eine größere Differenz zwischen den Dosen, die toxisch für Mikroorganismen sind und denen, die toxisch für Säugetierzellen in Kultur sind, besteht. (13)

Der Metabolismus des STREPTOMYCINS und seines Derivates DIHYDROSTREPTOMYCIN in Kultur verläuft anders als im Organismus bei der Abwehr von Mikroorganismen. Dort wird die Wirksubstanz aufgenommen, zur Wirkung gebracht, abgebaut, verdünnt und ausgeschieden. In der Gewebekultur wird die Wirksubstanz mit den Zellen und ihren Organellen konfrontiert, wirkt auf diese ein, wird metabolisiert, aber die Metaboliten werden nicht ausgeschieden, sondern verbleiben in den Zellen, den Interzellularräumen und im Medium erhalten und werden somit ständig wieder mit den Zellen und Zellorganellen konfrontiert. Im Nährmedium werden sie verdünnt, aber durch den internen Stoffumlauf immer wieder an den Platz einer Reaktion zurückgebracht. Dort reagieren sie wieder mit den Zellen, die anfänglich schon einmal durch sie beeinflußt wurden. Im Nährmedium wird die Wirksubstanz, hier das STREPTOMYCIN, wohl verdünnt, aber auch hier werden - besonders an der anfänglich offenen Schnittkante - die Zellen immer wieder mit den Metaboliten konfrontiert. Es tritt eine gewisse Summation ein, erkennbar an den wachsenden pathologischen Veränderungen in der Wachstumsrandzone der Explantate.

Durch diese unterschiedlichen Reaktionen der Antibiotika auf mikrobielle Infekte im Gewebe eines Organismus und Geweben in der Kultur, die wohl vitale Reaktionen zuläßt, die aber wie hier geschildert wird, nicht oder nur in etwa denen im Organismus entsprechen, entsteht eine Diskrepanz beider Reaktionen.

Für die Annahme, daß STREPTOMYCIN im Körper des Menschen in Derivate oder inaktive Metaboliten umgewandelt wird, gibt es keine Beweise. Es wird in einigen Körpergeweben verstärkt akkumuliert, z.B. in den Nieren, und es er-

scheint zweifelhaft, ob die Menge des Wirkstoffes, der gebunden wird, ausreicht, um die Differenz zwischen der angewandten und der ausgeschiedenen Droge zu erklären. (15) In der Kultur erscheint es durch Kumulation und Summation der Reize des Antibiotikums durchaus möglich, daß STREPTOMYCIN mit den Nukleinsäuren der Zellen eine feste Bindung eingeht, deren Folge dann zu einer Aberration der DNS führen würde und sich in verminderter oder total inhibierter Vitalität der kultivierten Zellen äußern würde.

Noch eine andere Erklärung gibt es für diesen eigenartigen Metabolismus des STREPTOMYCINS mit embryonalen Geweben in Kultur: Die molekular-biologische Forschung über die Makromoleküle des Organismus, wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipoproteinen, Enzymen und Membranen, läßt die Erklärung zu, daß die Fremdstoffe, hier die Antibiotika, mit zahlreichen Makromolekülen Wechselwirkungen eingehen.

Die Antibiotika unterliegen in der Kultur, genau wie im Organismus, der Biotransformation. Mit dem Unterschied, daß es auch in der Kultur zur Bindung von instabilen reaktiven Zwischenprodukten kommen kann, die mit bestimmten Gewebekomponenten feste konvalente Bindungen eingehen, und damit Makromoleküle der unmittelbaren oder weiteren Umgebung ihres Entstehens in der Zelle verändern können. Die durch die Instabilität der Metaboliten bedingte Kurzlebigkeit unterstreicht die Wichtigkeit von vitalen Untersuchungen; Gewebekulturen lassen die optimale Reaktion 3 - 4 Tage nach Ansatz erkennen. Die Bindung von Fremdstoffen an Makromoleküle eines tierischen Organismus, insbesondere Proteine und Nukleinsäuren, kann zu erheblichen biologischen Konsequenzen führen. (15) Aber auch noch andere Erklärungen gibt es für die spezifische Wirkung des STREPTOMYCINS auf Zellen in Kultur. STREPTOMYCIN erhöht die "coding" Eigenschaften von Säugtierzellen, so daß ein abnormes Protein entsteht.

Differente Aminosäuren werden in großer Anzahl benötigt, um im Nährmedium mit STREPTOMYCIN eine spezifische Zytotoxizität hervorzurufen. (17) Die Struktur des STREPTOMYCIN läßt erwarten, daß die beiden Guanidogruppen im Molekül für die Präzipitation der Nukleinsäure verantwortlich sind. (18) Bislang wurde angenommen, daß der fundamentale Eingriff am Ribosom beim Ablesen des Codes der Messenger-mRNS erfolgt, und daß es hier zu Ablesefehlern kommt. Eine andere Erklärung wäre aber, daß STREPTOMYCIN mit dem die Proteinsynthese auslösenden Initiatorprotein reagiert und damit ein Anlaufen der Synthese verhindert. (19)

Die Hypothese der Proteinsyntheseblockierung hätte vielleicht auch den Vorteil, hiermit die Wirkung des STREPTOMYCINS auf Zellen in Kultur besser zu erklären.

Die Zellen der Wachstumszone in der Kultur werden dem Angriff des Wirkstoffes überantwortet, das Antibiotikum kann sofort angreifen. Die Effekte der Antibiotika-Bindung an das Ribosom sind analog zu dem Prozeß der Hemmung einer komplexen Machinerie, irgendetwas kann immer passieren. (20)

Bei dem Aminoglykosid-Antibiotikum KANAMYCIN wird ein ähnlicher Komplex von Reaktionen ablaufen, wie bei anderen Aminoglykosid-Antibiotika. Durch spezifische Rezeptoren, die vielleicht auch kurzlebig sind, wird das Antibiotikum in den Zellen des Explantats festgehalten, durch den langsameren Ministoffwechsel im Explantat wird der Austausch<sup>im</sup> Plasma-Extrakt-Gel auch viel langsamer oder gar nicht eliminiert, so daß auch eine Reaktion mit den zellulären Nukleinsäuren durchaus möglich erscheint.

Sowohl die biologische Aktivität des GENTAMYCIN gegen Mikroorganismen als auch die toxischen Effekte gegen Mammalier-Zellen sind zu bedenken. (21) Besteht hier nicht vielleicht doch die Möglichkeit einer Erklärung

des Effektes des Antibiotikums auf Gewebe und Zellen in Kultur?

Die Einzelbestandteile des GENTAMYCINS können bei der langen Verweildauer in der Kultur, im Plasma-Extrakt-Gel, durch enzymatische oder andere milieubedingte Prozesse auseinandergebrochen werden. Dadurch könnten ganz anders als in situ doch toxische Formationen gebildet werden, die die Mitose inhibieren. Die Struktur des GENTAMYCIN - es ist ein Analogon eines Deoxyamin-streptamin-Antibiotikums, in das zwei neue Zucker - Gentosamin und eine Xylose - eingebaut wurden. Zwei Faktoren sind zu bedenken: Die Verwandtschaft zwischen Struktur und biologischer Aktivität. Der andere ist die günstige Gelegenheit der Manipulation der Moleküle durch Einsetzung eines spezifischen Zuckers. Die biochemische Manipulation mit dem Amino-oligo-saccharid-Molekül lassen uns die biologischen Effekte der spezifischen Teile der Molekularstruktur erkennen. Für die zytopharmakologischen Aspekte dieser Untersuchungen ist es von großer Bedeutung, daß ein Fremdstoff selbst oder an verschiedenen Loci des Explantats durch unterschiedliche Mechanismen zu toxisch wirksamen Stoffen oder Stoffwechselprodukten biotransformiert wird. Auch hier ist zu bedenken, daß eine renale Elimination wie im Organismus für die Kulturen nicht besteht, daß im Gegenteil dazu eine Kumulation von Metaboliten das Risiko toxischer Reaktionen in sich trägt. -

Die Reaktionen der TETRACYCLINE in der Kultur unterliegen ähnlichen Bedingungen wie es für PENICILLIN und die AMINOGLYKOSID-ANTIBIOTIKA beschrieben wurde. Die elementären Lebensvorgänge der Zellen und Gewebe in Kultur sind anders als die Plastizität des Organismus, d.h. die dem Organismus eigene Fähigkeit, sich durch Reparations- und Ausgleichvorgänge einem schädlichen Stoff anzupassen. (16)

Anders die Gewebe in Kultur: Sie sind nur ein Komplex organoider Struktur mit einem geringen zellulären und



interzellulären Stoffwechsel, der nur in etwa dem Metabolismus eines Organismus entspricht.

Die Kenntnis von der zellulären Biotransformation der Antibiotika entspricht der Erkenntnis, daß nahezu alle Stoffe im Organismus umgewandelt werden, und daß bei diesen Umwandlungsprozessen potent-toxische Substanzen entstehen können. Die Biotransformation von Fremdstoffen in der Kultur kann dazu führen, daß ein für den Organismus wichtiger Stoff durch eine qualitative Wirkungsänderung zu einem biologisch wirksamen Gifteffekt führt. (16)

Diese Feststellung konnte an den hier geschilderten Untersuchungen im vollen Umfang bestätigt werden. Für die Reaktionen mit TETRACYCLINen kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß eine Biotransformation durch unspezifische und hochaktive zelleigene Enzymsysteme stattfindet. Als Beispiele hier die Explantate von Epithelien, wie der Leber, von Lunge, Niere, Darm, der Haut mit einer hohen enzymatischen Aktivität zur Proteolyse, die Fremdstoffe sehr unterschiedlicher Struktur biotransformieren können. In Kultur haben wir für die TETRACYCLINE aber ganz andere Bedingungen als beim Organismus. Antibiotika hemmen die Aktivität bestimmter Enzymsysteme beim Menschen; sollte ein ähnlicher Effekt bei den Explantaten, wie hier aufgezeigt wird, erfolgt sein? Dies könnte eine der Erklärungen für die Entstehung spezifischer-funktioneller Störungen, die auch mit zyto-morphologischen Veränderungen einhergehen, sein. Die Fähigkeit der Antibiotika, die Synthese der Proteine und der Nukleinsäuren zu hemmen, muß sich unbedingt auf die normale Entwicklung der Gewebe, auch in Kultur, auswirken, die sich infolge ihrer Funktionen in permanenter Erneuerung befinden. Dieser Prozeß erfordert eine ununterbrochene Tätigkeit verschiedener Enzymsysteme, deren spezifische Inhibitoren gerade die Antibiotika darstellen. (22)

Aber die Gewebe in Kultur besitzen nicht die großen potentiellen Möglichkeiten, die Wirkung der Antibiotika zu



eliminieren. Der Effekt, der durch die TERRACYCLINE induziert wird, ist das Resultat einer Wechselwirkung zwischen den Molekülen des Antibiotikums und den Molekülen, aus denen das biologische Objekt, hier die Kultur, zusammengesetzt ist. Je höher die Moleküle des Antibiotikums spezifiziert sind, desto wahrscheinlicher ist es, daß gewisse spezifische Moleküle des biologischen Objektes mit denen des Antibiotikums agieren und seine Folgeeffekte induzieren kann.

Für diese spezifischen Moleküle wurde der Terminus Rezeptor gewählt. Antibiotika-Rezeptor-Wechselwirkungen in der Kultur müssen als eine wechselseitige Verformung der Antibiotika und der Rezeptoren angesehen werden. Die Induktion eines biologischen Effektes ist das Resultat aus einer Wechselwirkung zwischen den Molekülen des Antibiotikums und spezifischen Rezeptoren des biologischen Objektes. (23)

Die einem Organismus oder wie hier einer organoiden Formation aufgezwungene Invasion eines Pharmakons - hier die TETRACYCLINE - wird beantwortet mit einer Elimination. Die naheliegendste Form der Elimination bildet die Exkretion mit Hilfe der Ausscheidungsorgane. In der Kultur und hier besonders die Kultur im Plasma-Extrakt-Gel "im hängenden Tropfen" liegt ein vollkommen anderer Modus zu Grunde.

Die TETRACYCLINE werden durch die im Explantat und im Nährmedium vorhandenen Enzyme biotransformiert, die in den Mikrosomen lokalisiert sind. Diese Biotransformation kann bei Zellen in Kultur Antibiotika-Metaboliten erzeugen, die in ihrer Aktivität die der Ausgangsformen noch übersteigen, aber nicht ausgeschieden werden, sondern in der Kultur für eine bestimmte Zeit erhalten bleiben. Diese Biotransformationen oder auch die aus den Transformationen entstandenen Metaboliten können verschiedene Reaktionen des Moleküls einleiten. (24) Diese Reaktivität der Zellen auf Antibiotika führt im allgemeinen

in zwei bevorzugte Richtungen: der Zellstimulation oder der Zellinhibition, wie es in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt wird.

Wirkungen und Nebenwirkungen eines Pharmakons sind in hohem Maße von dessen Schicksal oder besser Verbleib im Organismus, hier besser dem organoiden Zellkomplex, abhängig. Das Pharmakon wirkt auf Zellen und Gewebe und gleichzeitig wirken diese auf die chemische Substanz.

Eine Pino- oder Phagozytose des Pharmakons verändert die Zusammensetzung der Zelle, das Gleichgewicht wird gestört. Das Gewebe und die Zelle wehrt sich gegen diesen Eingriff und versucht, das Gleichgewicht wieder herzustellen. Es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen Pharmakon und Zelle. Die pharmakologische Wirkung kann nur entstehen, wenn sich das Pharmakon mit dem Rezeptor verbindet. (25) Aber ein Rezeptor oder ein Pharmakon-Rezeptor-Komplex kann nur agieren, wenn genügend Substanz zum Rezeptor vorstößt, was durch die Architektur des Plasma-Extrakt-Gels und des in ihm ruhenden aber voll vitalen Explantats gewährleistet wird. Die Permeations-Barrieren brauchen hier weniger berücksichtigt zu werden, weil explantiertes Gewebe offen mit seinen Schnittkanten zur Induktion des Antibiotikums bereitsteht. Exkretion erfolgt in das Nährmedium und agiert von dort, wenn auch verdünnt, wieder auf die Zellen. Gut zu beobachten ist in der Kultur die Enzymfreisetzung und eine daraus resultierende Biotransformation des Pharmakons, einer enzyminduzierten metabolischen Umwandlung mit der Bildung von mehreren Metaboliten. (26) Jeder dieser neu gebildeten Molekülspezies nimmt nun an den Prozessen im Explantat und im Nährmedium teil. Arzneimittel-abbauende Enzyme sind fast in allen Organen, hier deren Zellen und Geweben, vorhanden. (27)

In den Gewebe- und Zellkulturen, die hier vorgelegt werden, reagiert das spezifische Antibiotikum mit verschiedenen embryonalen Zellen unterschiedlicher Spezifität, z.B. Bindegeweben, Epithelgeweben und Knochengeweben.

Der Wirkstoff zeigt bei den durch das Antibiotikum ausgelösten zellulären Reaktionen der Zellstimulation oder Zellinhibition, die Wirksamkeit von metabolischen Prozessen auf, die entstehen, wenn keine Exkretion innerhalb eines Plasma-Extrakt-Gels erfolgt. Eine zytotoxische Reaktion der Explantate und ihrer Wachstumszone ist die Folge. -

Noch eine andere Wirkungsmöglichkeit steht zur Diskussion: Da keine direkte Elimination durch eine renale Ausscheidung in der Kultur möglich ist, könnte es in dem Plasma-Extrakt-Gel und in dem Explantat nebst Wachstumszone zu einer Kumulation des Antibiotikums oder seiner Derivate bzw. Metabolite kommen. Dieses Ausmaß der Kumulation ist von der Eliminationsgeschwindigkeit des Antibiotikums abhängig. Bei den Geweben in Kultur besteht nur eine Elimination durch das Umsetzen und Auswaschen über längere Zeit. Ein Teil der Metaboliten wird im Explantat zurückgehalten und wirkt dann wieder, wenn auch verdünnt, auf die Wachstumszone. Das Risiko einer toxischen Kumulation ist gegeben, wenn die Kulturen im hängenden Tropfen kultiviert werden, weniger wenn sie in Rollerröhrchen gehalten werden, da dort eine ständige Auswaschung für die Verdünnung der toxischen Substanz sorgt. (28)

Ähnlich wie beim menschlichen Organismus dürfen wir für die Metabolisierung einer Arzneisubstanz in der Kultur drei Phasen unterscheiden:

Den primären Metaboliten, der als chemisches Substrat gebildet wird, nachdem eine Substanz mit dem biologischen System konfrontiert wurde.

Den sekundären Metaboliten, der aus dem enzymatischen Prozeß hervorgeht, der den Metaboliten als Substrat benutzt und den "METABONATE" einer Substanz als Produkt des Metabolismus, die aber nicht dem ursprünglichen Metaboliten entspricht. Er ist das Ergebnis eines nicht-enzymatischen Austausches im biologischen System. (29)

In der "drug action" können drei Phasen unterschieden

werden, die pharmazeutische, die pharmakokinetische und die pharmakodynamische Phase. Bei zwei Phasen spielen biochemische Prozesse eine prädominierende Rolle. Von der einen Seite wird die Induktion des Effektes durch eine Substanz verursacht, es ist dies die pharmakodynamische Phase, basierend auf einer Interferenz der bioaktiven Moleküle mit chemischen Prozessen im biologischen Objekt. Andererseits agiert das biologische Objekt mit den Substanz-Molekülen durch chemische Umwandlung. Dies ist ein wichtiger Aspekt der pharmakokinetischen Phase. Er ist häufig entscheidend für "time-plasma concentration relationship" der Substanz. Biochemische Veränderungen können zu einer Detoxikation führen und auch eine Verwandlung einer inaktiven Verbindung in eine aktive bis zu einer möglichen Toxifikation. Der Bioaktivierung folgen weitere metabolische Umwandlungen, die zu einem Aktionsverlust führen, einer Bioinaktivierung oder Detoxifikation. (30) Solche Vorgänge könnte man auch für die hier vorgelegten Untersuchungen annehmen.

Antibiotika und Sulfonamide passieren die plazentare Barriere, dadurch entstehen im mütterlichen und im plazentaren Serum die gleichen Konzentrationen. PENICILLIN, TETRACYCLINE und ERYTHOMYCIN scheinen nicht gefährlich für den Foeten, während die Aminoglykoside STREPTOMYCIN, KANAMYCIN, NEOMYCIN, POLYMYCIN und BACITRACIN als auch die Sulfonamide nur mit äußerster Vorsicht anzuwenden sind. Entgiftungsmechanismen sind im Neugeborenen nicht vorhanden und die maternalen Mechanismen sind vielleicht nicht stark genug, um beim Foeten eine Detoxikation herbeizuführen.

Auch diese Ergebnisse kann man mit den vorgelegten vergleichen, denn hier wie dort wird embryonales Gewebe mit den Antibiotika konfrontiert und an den Wirkungsorten besteht keine Abwehrfunktion; so kann es zu Toxikationen kommen. (31)

Noch eine andere Funktion lebender Gewebe ist hier zu bedenken: Die Bindung der antibiotischen Wirkstoffe an die Plasmaproteine des Hühnergewebes resp. Hühner-Embryonal-

Extraktes. Drei Bindungsarten sind zu unterscheiden:

Die Ionenbindung, die hydrophoben Wechselbeziehungen und die Wasserstoffbrückenbildungen. Man kennt aber auch Arzneimittelmoleküle, die sehr fest an Proteine gebunden sind, ohne eine Ionenbindung einzugehen. Hydrophobe Gruppen sind z.B. aromatische Ringe und aliphatische Ketten und sind in organischen Arzneimittelmolekülen sehr weit verbreitet. Dementsprechend häufig sind auch die hydrophoben Wechselbeziehungen zwischen Arzneimitteln und Eiweißkörpern. Nur ein freies, ungebundenes Antibiotikum kann in das Gewebe diffundieren, denn ein Gefäßsystem wie beim Organismus steht in der Kultur nicht mehr zur Verfügung. Daher wird auch kein direktes Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Arzneimittel als Puffersystem mehr zur Verfügung stehen, aber durch die Dissoziation eines Arzneimittel-Protein-Komplexes könnte über längere Zeit eine relativ konstante Konzentration an freier Substanz aufrechterhalten bleiben. (32)

Noch einen anderen Autor möchte ich hier zur Sprache kommen lassen: Aus diesen Untersuchungen könnte der Schluß gezogen werden, daß bei verschiedenen Konzentrationen des in den Nährboden - hier das Plasma-Extrakt-Gel + Explantat - diffundierenden Antibiotikums ein unterschiedlicher Grad der Hemmung oder sogar eine ausgesprochene Wachstumsbegünstigung nach dem ARNDT-SCHULZschen Gesetz = Kleine Reize fördern, große hemmen, größte lähmen, vorliegt. Denn im Körper oder auch im Gewebe-explantat könnten im ganzen oder auch lokal, ungenügende oder sogar wachstumsbegünstigende Konzentrationen des Antibiotikums vorliegen oder sich erst ausbilden.

Die Widersprüche zwischen der Wirkung in situ und in vitro sind durch die Kulturmethodik bedingt, durch ein Versagen der körperlichen Abwehr und deren unentbehrlicher Mitwirkung bei der Resorbierbarkeit, der Metabolisierung und der Ausscheidung des Antibiotikums. (33,34)

Literaturverzeichnis : Diskussion 2)

- (1) LEWIS, W.H. : Pinocytosis.  
Bull. Johns Hopkins Hosp. 49, 17-26 (1931)
- (2) NOVIKOFF, A. : Lysosomes and related particles.  
In "The cell", vol. 2, pp. 423-488  
Academic Press, New York (1963)
- (3) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen.  
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart,  
New York (1971)
- (4) DREWS, J. : Klinische Pharmakologie aktueller  
Antibiotika und Chemotherapeutika.  
Dtsch. Med. J. 23, 259-265 (1972)
- (5) BIGGER, J.W. : Inactivation of penicillin by serum.  
Lancet 1944/II, p. 400
- (6) CHOW, B.F.  
and MCKEE, C.M. : Interaction between crystalline  
penicillin and human plasma proteins.  
Science 101, 67 (1945)
- (7) TOMPSETT, R.  
SCHULTZ, S.  
and McDERMOTT, V. : The relation of protein binding to  
the pharmacology of antibacterial  
activity of penicillins.  
J. Bact. 53, 581 (1947)
- (8) COOPER, P.D. : Site of action of radiopenicillin.  
Bact. Rev. 20, 28-48 (1956)
- (9) KUNIN, C.M. : Clinical significance of protein  
binding of the penicillins.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 145, 282-290 (1967)



- (10) WEINSTEIN, L. : Antibiotics. Chapter 57, The Penicillins, p.1204 in GOODMAN, L.S. and GILMAN, A : The Pharmacological Basis of Therapeutics, Fourth Ed. Macmillan Comp. London, Toronto (1970)
  
- (11) PRATT, R. : Cytochemical interpretation of the  
and DUFFRENOY, J. : mechanism of penicillin action.  
Bact. Rev. 12, 79-103 (1948)
  
- (12) PARK, J.T. : The mode of action of penicillin.  
and STROMINGER, J.L. : Science 125, 99-101 (1957)
  
- (13) GOLDBERG, H.S. : Antibiotics. Their Chemistry and  
Non-medical use. D. van Nostrand  
Company Inc. Princeton, 1959
  
- (14) KNOTHE, H. : Ist die Serum-Eiweiß-Bindung der  
Antibiotika von praktischer Bedeutung ? Medical Tribune, Nr. 31,  
p. 24, In consilio-Korrespondenz, 1974
  
- (15) MOLITOR, H. : Pharmacology and Toxicology of Anti-  
and GRAESSLE, O.E. : biotics. J. Pharmacol. Exp. Therap.  
98/II, Nr. 4, 1-60 (1950)
  
- (16) STIER, A. : Zur Bedeutung der Biotransformation  
von Fremdstoffen : Primäre Gift-  
wirkung durch konvalente Bindung.  
Internist 14, 202-211 (1973)
  
- (17) MOSKOWITZ, M. : Amino acid control of streptomycin  
and KELKER, N. : action on mammalian cells.  
Nature. 205, 476-477 (1965)
  
- (18) JACOBY, G.A. : The effect of streptomycin and other  
and GORINI, L. : aminoglycoside antibiotics on protein  
synthesis. Antibiotics I, Springer-Ver-  
lag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967



- (19) SCHRINNER, E. : Zum Wirkungsmechanismus der Antibiotika. Dtsch. Med. J. 22, 647-652 (1971)
- (20) PESTKA, S. : Inhibitor of ribosome function. Ann. Rev. Biochem. 40, 697-710 (1971)
- (21) JACKSON, G. G. : Gentamicin summation. First Intern. Symposium, Paris, January 1967
- (22) PLANELJES, J. : Wirkung der Antibiotika auf die sub- and CHARITONOWA, A. : zellulären Strukturen der Parenchymorgane und den Hypothalamus. Moderne Medizin 1, 15-22 (1971)
- (23) ARIENS, A. J. : A molecular basis for drug action. and SIMONIS, A. M. : J. Pharm. Pharmacol. 16, 137-157 (1964)
- (24) BICKEL, M. H. : Pharmakametabolismus und Pharmakokinetik als Grundlage der klinischen Prüfung neuer Medikamente. Therap. Umschau 28, 250-256 (1971)
- (25) BICKEL, M. H. : Indications actuelles des associations d'antibiotiques. Méd. et Hyg. 25, 833-836 (1957)
- (26) BICKEL, G. : Antibiothérapie. Méd. et Hyg. 26, 881-900; 1392-1397 (1968)
- (27) PAUMGARTNER, G. : Hepatische Enzymindikationen und Arzneimittelwirkungen. Therap. Umschau 28, 234-240 (1971)
- (28) DETTLI, L. : Pharmakokinetik bei repetierter Arzneimittelapplikation: Kumulationslehre. In KÜMMERLE, H. P., GARRETT, E. R. u. SPITZY, K. H. : Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie. pp. 59-65, Urban & Schwarzenberg, München, Wien 1971

- (29) BECKETT, A.H. : The importance of metabolic studies in drug research and medicine design. Industrial aspects of biochemistry. Ed. E. SPENCER, Federation of European Biochemical Societies, pp. 693-724 (1974)
- (30) ARIENS, E.J. : Modulation of the bioavailability  
and SIMONIS, A.M. : profile of drugs ( bioactive compounds) by molecular manipulation. Industrial Aspects of Biochemistry, pp. 725-740 (1974)
- (31) RUMMEL, H.H. : Nil nocere ! Antibiotika und Sulfonamide in der Schwangerschaft. (Plazentapassage und fetale Toxizität). Münchn. Med. Wschr. 104, 1870-1872 (1962)
- (32) KRIEGLSTEIN, J. : Bestimmungsmethoden, physikochemische Grundlagen und pharmakokinetische Bedeutung der Plasma-Protein-Bindung von Arzneimitteln. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 1527-1529 (1973)
- (33) ELKELES, G. : Probleme und Wege antiinfektiöser Therapie. Med. Klin. 67, 1250-1255 (1972)
- (34) ELKELES, G. : Bakteriotherapie und Umstimmungstherapie trotz, statt und mit Chemotherapie. Med. Klin. 62, 982-985 (1967)

### 3) Die Ergebnisse der Wirkungen von Antibiotika auf embryonale und erwachsene Tiere.

Nicht nur in der Kultur sondern auch an embryonalen und erwachsenen Tieren ließen sich die Resultate wiederfinden, oder aber es traten ganz andere Ergebnisse durch die Einwirkung der Antibiotika auf.

Die Erwähnung dieser Untersuchungen ist von großer Wichtigkeit, denn sie tragen zum Verständnis der vorgelegten Untersuchungen bei, obwohl sie über das Thema hinausgehen dürften. -

#### PENICILLIN

Die Zytotoxizität des PENICILLINS läßt sich auch an jungen Embryonen und an erwachsenen Tieren bestätigen.

So werden männliche und weibliche Reismotten, *Corcyra cephalonica* Staint., die während der Aufzucht 100 ppm PENICILLIN im Futter erhalten haben, im Gewicht 12,2 % schwerer als die Kontrollen. (1)

Albinomäuse erhielten eine einmalige Dosis in die Schwanzarterie in Form einer 10 - 15 % wässrigen Lösung verschiedener PENICILLINE. Sämtliche Verbindungen ergaben ähnliche Symptome der Intoxikation. (2) Sofort nach Injektion traten motorische Stimulationen auf, der Atem wurde unregelmäßig, Ataxie greift um sich. Diesen Manifestationen folgte eine Abnahme der Respiration, allgemeine Depression und Schwäche der Körpermuskulatur. Der Tod tritt innerhalb weniger Minuten bis zu 6 - 18 Stunden nach der Applikation ein.

Um die intrarenale Verteilung von appliziertem PENICILLIN festzustellen, erhielten Hunde 3 000 i.E. intravenös oder 20 i.E./kg Körpergewicht als ein Parameter zu den therapeutischen Dosen. Nach der Infusion wurden die Gewebe-Konzentrationen innerhalb der Cortex, Medulla und Papilla der Hunde gemessen; sie zeigten beträchtliche Variationen, abhängig vom Typ des Antibiotikums und dem

Status der Hydratation des Tieres. (3) Am isolierten Hundeherzen wurde die kardiale Dekompensation an der Hunde-Herz-Lungen-Präparation durch 750 - 1 000 mgm erzielt. Es wurden kardiale Arrhythmien gemessen, die diesen Effekt begleiteten. (4)

Die Vorstellungen, nach denen Antibiotika - besonders PENICILLIN - für Warmblüter ungiftig seien, sind nicht richtig. Es führt bei einzelnen Tierarten zu Schäden. (5)

PENICILLIN in einer Dosis von 100 000 i.E. führt beim Meerschweinchen zu generalisierten Krämpfen, Lungenblutungen und Entercolitis. Beim Kaninchen tritt unter der Anwendung hoher Dosen eine interstitielle Nephritis auf. Beim Menschen selbst führen zu hohe Dosen zu neurotoxischen Effekten. Bei Injektion von PENICILLIN in Hohlräume des ZNS ist Vorsicht geboten, da irreparable Schäden verursacht werden können. (5)

In der Literatur ist mehrfach auf die Beeinflussung des Kohlehydrat-Stoffwechsels durch antibiotisch wirksame Substanzen hingewiesen worden. Hühnerküken reagieren auf PENICILLIN mit funktionsbedingten Veränderungen im Nebennierenmark. Beim Schwein, beim Kalb und beim Schaf werden nach PENICILLIN-Gaben in alimentärer oder therapeutischer Dosis erhöhte Blutzuckerwerte gefunden, die mit einer verbesserten Kohlehydratesorption erklärt werden. Der Glykogengehalt der Leber steigt unter PENICILLIN-Behandlung an. (6)

Verschiedene Verbindungen, zytopharmakologisch wirksam, klinisch bedeutsam, geben in Kultur signifikante Resultate, dazu gehört auch PENICILLIN. Im Gegensatz zu anderen Antibiotika reduziert PENICILLIN in einer Konzentration von 4 000 i.E. Lipoidablagerungen, wenn es einer Nährlösung zugefügt wird, die gleichzeitig 3 mg Cholesterin/100 ml enthält. (7)

Daphnia, als kleines Laboriumstier, regte dazu an, von einem pharmakologischen Blickwinkel aus, die Toxizität der Antibiotika zu beleuchten. Daphnia pulex wurde in einem Temperaturinkubator bei 20°C gehalten, in einer gemischten Salzlösung mit pH 7,9 .

In 250 ml-Flaschen wurden je 12 Daphnien gegeben, chemotherapeutische Substanzen (Antibiotika) wurden in 6, 12, 25 und 50 mg/ml hinzugegeben. PENICILLIN wurde wegen seiner geringen Toxizität gewählt, keine toxische Wirkung wurde erzielt. Die Daphnien zeigten durchaus eine normale Aktivität während des Tests. (8)

PENICILLIN wurde in Dosen zu 0,5 bis 2,5 mg zur Prüfung der Toxizität Hühnerembryonen injiziert. Bei Penicillin-Dotation 45 - 50 % Mortalität. Aber bei den geringen Dosen auch ein Ergebnis, das wieder mit unseren Untersuchungsergebnissen übereinstimmt: Penicillin hebt den Mitoseindex von 35,5 auf 47,5 an. Die Zahl der Telophasen nimmt bis zu 300 % unter der Penicillinbehandlung zu.

(9) Die Zytotoxizität des PENICILLINS wurde in Untersuchungen bestätigt. (10)

Erhielten Mäuse intravenös, intraperitoneal, subcutan und oral PENICILLIN, so konnte es im Vergleich zu anderen Antibiotika als die am wenigsten toxische Substanz festgestellt werden. (11)

Beobachtungen über die tierspezifische Toxizität des PENICILLINS wurden am Meerschweinchen erbracht. (12, 14) PENICILLIN ist im Tierversuch als das am geringsten toxische Antibiotikum, sowohl bei intraperitonealer als auch intravenöser Applikation erkannt worden. (13)

Die Existenz einer ungewöhnlichen Sensitivität auf PENICILLIN wurde auch beim Syrischen Hamster gefunden. Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine größere Mortalität der behandelten im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren festgestellt. Injektion mit 1 000 i.E. subcutan und 5 000 i.E. intraperitoneal. Eine höhere Mortalität tritt bei 100 000 i.E. auf. Die intraperitoneale Anwendung führt zu einer höheren Mortalität als die subcutane Applikation. (15)

Hühnerküken wurden Dosen von 0,5 bis 2,5 mg injiziert. 0,5 mg erzielten einen das Wachstum stimulierenden Effekt gegenüber den nicht behandelten Kontrollen. (16)

Die Metamorphose der Kaulquappen von *Rana tigrina* kann durch PENICILLIN verzögert werden, die mit 80 i.E./ml 7 Tage behandelten, metamorphosierten erst nach 8 - 15 Monaten. (17)

Kaulquappen von *Bufo vulgaris* wurden in unterschiedlichen Konzentrationen von 2 000 - 200 000 i.E. gehalten; jeden Tag wurde das Wasser gewechselt. Von 2 000 - 12 000 i.E. stieg die Totallänge proportional zur Menge des PENICILLINs an, bei höheren ließ das Wachstum nach und bei der höchsten Stufe hörte das Wachstum ganz auf. (18)

Größe, Gestalt und Vermehrungsrate von *Tetrahymena pyriformis* werden auch durch PENICILLIN beeinflusst. Bei 500 bis 1 000 i.E./ml nimmt die Anzahl der Tiere zu, mit steigender Konzentration von 2 000 - 20 000 i.E. nimmt sie wieder ab. (19)

Froschlarven der Spezies *Rana esculenta* L. und *Rana temporaria* L. erhielten 50 i.E./ml Aquarienwasser und reagierten mit einer Hemmung der Gewichts- und Längenzunahme. Die Metamorphose verzögerte sich. Höhere Konzentrationen, 10 und 250 i.E. erwiesen sich bei längerer Applikationsdauer als toxisch. (20)

Wenn Vitamin B<sub>12</sub> und PENICILLIN an Larven von *Rana catesbiana* und *Bufo vulgaris* verfüttert wurden, so unterblieb die Metamorphoseverzögerung. 500 mg PENICILLIN/Liter + 4 Vitamin B<sub>12</sub> fördern das Wachstum und die Metamorphose. (21, 22)

Die Nachkommenschaft von Mäusen, die während der Trächtigkeit mit PENICILLIN behandelt wurden, 50 i.E. und 500 i.E., zeigten unter 50 i.E. eine vorübergehende Wachstumsförderung, der aber bald eine Verlangsamung folgt. Die hohe Dosis von 500 i.E. bewirkte eine eindeutige Wachstumshemmung. (23)

Vom PENICILLIN weiß man schon sehr lange, daß es bei intrathekalen Anwendung epileptische Anfälle auslösen kann.

Bei intravenöser Anwendung verhältnismäßig hoher Dosen können neurotoxische Ausfallerscheinungen auftreten. (24)

Benzylpenicillin führte beim Kaninchen zu neurotoxischen Symptomen. Bei Spiegeln über 1 500 i.E./ml Blut traten generalisierte Krampfpotentiale auf. (25)

PENICILLIN G verbindet sich mit dem Albumin des Rinderserums an einem Seitenast mit einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe, mit einer Bindungskonstanten, die größer als  $4,0 \times 10^3/\text{M}$ . (26)

Wenn es das beim Rinderserum tut, so müßte es ja auch beim Hühner-Serum zu ähnlicher Verbindung kommen.



Literaturverzeichnis : Diskussion 3) PENICILLIN

- (1) BHANU, D. : Differential growth response of the male and female rice moth to antibiotic supplements. Nature, 1227 + (1963)
- (2) RUDZIT, E.A.  
and LIS, M.B. : Comparative evaluation of the toxicity of penicillins for albino mice. Russ. Pharmacol. Toxicol. 31, 114-117 (1968)
- (3) WHELTON, A.  
SAPIR, D.G.  
CARTER, G.G.  
KRAMER, J.  
and WALKER, W.G. : Intrarenal distribution of penicillin, cephalotin, ampicillin and oxytetracyclin during varied states of hydration. J. Pharmacol. Exp. Ther. 179, 419-428 (1971)
- (4) SWAIN, H.H.  
KIPLINGER, G.F.  
and BRODY, Th.M. : Actions of certain antibiotics on the isolated dog heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 117, 151 - 159 (1956)
- (5) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen. F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 1971
- (6) GROTH, W. : Untersuchungen über die Wirkung einiger Antibiotika und eines Antidiabetikums auf die Nebennieren und die LANGERHANSschen Inseln des Pankreas beim Huhn. Zbl. f. Veterinärmedizin VII, 702-714 (1960)

- (7) CURTIS, R.G.  
and GALVIN, M.P. : Application of a tissue culture  
technique to screen compounds  
for the prevention of lipoid  
deposition in aorta cells.  
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci.41,  
687-694 (1963)
- (8) TURNER, J.C.  
and LANNON, T.J. : Effects of antibiotics on  
Daphnia.Proc.Soc.exp.Biol.Med.  
80,684-688 (1952)
- (9) CHERNUKH, A.M.  
and ALEKSANDROV, P.N.: The effect of some drugs on  
embryogenesis and mitosis.  
Patol.Fiziol.i Eksperim Tera-  
piya 9,41-44 (1969)
- (10) HERRELL, W.E.  
and HEILMAN, D.H. : Tissue culture studies on cyto-  
toxicity of bactericidal agents.  
III. Cytotoxic and antibacterial  
activity of gramicidin and peni-  
cillin.Comparison with other  
germicides. Am.J.Med.Sci.206,  
221-226 (1943)
- (11) BACHARACH, A.L.  
CLARK, B.J.  
McCULLOUGH, M.  
and TOMICH, E.G. : Comparative toxicity studies  
on ten antibiotics in current  
use.J.Pharmacy and Pharmacol.  
11,737- 741 (1959)
- (12) STUART, P.  
and SLAVIN, G. : Toxicity of Penicillin to gui-  
nea pigs. Nature 167,319-320  
(1951)
- (13) siehe (11)
- (14) STEVENS, K.M.  
and GRAY, I. : Studies on penicillin toxicity  
in guinea pigs. Antibiot.Chem.  
3,731-740 (1953)

- (15) SCHNEIERTSON, S.S. Toxicity of penicillin for the  
and PERIMAN, E. : syrian hamster. Proc.Soc.exp.  
Biol.Med.91,229-230 (1956)
- (16) TCHERNOUKH, A.M. The influence of some antibio-  
and ALEXANDROV, P.N. : tics and chemotherapeutic drugs  
on the development of the embryo  
of the hen. IIInd Int.Symp.Chemo-  
therapy, Naples, 1961, I. pp.342  
- 349 (1963)
- (17) MEDDA, A.K. On the action of penicillin on  
BHATTACHARYA, G.C. the retardation of metamorpho-  
and NANDI, P.N. : sis of tadpoles. Sci.a.Culture  
22,173-174 (1956)
- (18) CHIUINI, F. : Azione della Penicillina sull'  
accrescimento e sulla differen-  
ziazione delle larve di anfi-  
Boll.Soc.ital, Biol.spec.28,  
1178-1179 (1952)
- (19) NEMETH, G. Effect of Penicillin on Tetra-  
and CSIK, L. : hymena pyriformis, strain GL.  
I. Multiplication and change  
of form. Acta Biol.Acad.Sci.hung.  
11,405-410 (1961)
- (20) DABROWSKI, Z. : The influence of penicillin  
and streptomycin on the growth  
and development of frog tad-  
poles Rana esculenta L. and  
Rana temporata L. Acta biol.  
cracov.Ser.Zool.3,173-194 (1961)
- (21) CHIH-YÜN HSÜ, The effect of penicillin on  
PI, Ch.-M. frog development.  
and HSÜ-MU LIANG : Embryologia (Nagoya) 7,179-183  
(1962)

- (22) GALAMI, A. Effetto di alcuni antibiotici  
e MAGGIORE, L. : e della vitamina B<sub>12</sub> sull'  
accrescimento e sulla metamor-  
fosi dei gisini di Bufo vul-  
garis. R.C.Ist.sup.Sanita 23,  
1008-1015 (1960)
- (23) BOUCHER, D. Développement post-natal des  
et DELOST, P. : descendants issus de mères  
traitées par la pénicilline  
au cours de la gestation chez  
la souris. C.R.Soc.Biol.(Paris)  
158,528-532 (1964)
- (24) NEUNDÖRFER, B. : Medikamentös bedingte neurolo-  
gische und muskuläre Störungen.  
Med.Welt 24,676-679 (1973)
- (25) WEIHRAUCH, T.R. The neurotoxic effect of benzyl-  
SCHMIDT, W. penicillin and ampicillin stud-  
HÖFFLER, D. ied in the rabbit. Arzneim.-  
und KRIEGLSTEIN, J. : -Forsch.(Drug Res.)24,317-321  
(1974)
- (26) HSU, L. Structure relationship for  
MA, I.K.H. binding of sulfonamides and  
JUN, H.W. penicillins to bovine serum  
and LUZZI, L.A. : albumine by fluorescence probe  
technique. J.Pharmac.Sci.63,  
27-31 (1974)

## STREPTOMYCIN und DIHYDROSTREPTOMYCIN

Der Anwendung des STRM in vitro an embryonalen Geweben und Zellen sollen die Ergebnisse von Untersuchungen an Versuchstieren gegenübergestellt werden.

Eikapseln mit schlüpfbereiten Embryonen von Australorbis glabratus wurden mit Salzlösungen inkubiert, die PENICILLIN und STRM enthielten. Während Penicillin keine Wirkung zeigte, wurde in einigen Fällen durch STRM die Schlüpftrate herabgesetzt. (1) Zytotoxizität wird durch Antibiotika hervorgerufen. STRM führt auch zur Destruktion der Haarzellen. (2)

Die pathologischen Veränderungen des Sinnesepithels der Crista ampullaris beim Meerschweinchen wurden nach Dotation von Streptomycin untersucht. Der Sensibilitätsunterschied der Toxikose zwischen dem zentralen und peripheren Bereich der Crista ampullaris konnte bestätigt werden. (3)

Wurde das Bronchialepithel des Hühnerembryos mit Hilfe der Organ-Kultur-Methode untersucht, so ergaben sie gleiche Ergebnisse wie bei den eigenen Untersuchungen, nur 7 µg STRM werden toleriert. (4)

Installation von STRM in die Bulla bei der Katze ruft unmittelbar ein Vestibularsyndrom auf derselben Seite hervor, gefolgt von schwerem Nystagmus, Gleichgewichtsstörungen mit Fallneigungen. Es handelt sich um einen spezifischen, dosisunabhängigen Effekt. (5)

Bei den Sacculus-Haarzellen des Goldfisches bewirkt das STRM eine Unterdrückung der Mikrosomenpotentiale des Innenohres. (6)

Funktionelle und morphologische Unterschiede in Nieren von Hunden nach parenteraler Anwendung von Streptomycin. Subcutane Injektionen von STRM wirken auf das Canaliculus-Epithel mit dystrophischen Änderungen. (7)

Bei Larven von Rana esculenta L. und Rana temporaria L. kam Dihydrostreptomycin in folgenden Konzentrationsstufen

von 0,5, 1,0 und 1,5 mg/ml Aquarienwasser zur Anwendung. STRM bewirkte eine Entwicklungs-Hemmung bei den Larven beider Froscharten und hatte bereits in der schwächsten Konzentration eine gewisse Toxizität, wobei sich die Larven von *R. temporis* als etwas widerstandsfähiger erwiesen. (8)

Am isolierten Hundeherzen wurden STRM und Dihydro-STRM angewendet. Die Effekte sind identisch, annähernd 3 Gramm beider Substanzen riefen schwere Herzausfälle hervor. (9)

Auch die hinreichend bekannte *Daphnia pulex* wurde auch für Tests mit STRM herangezogen. Eine Konzentration von 1,0 µg/ml wirkt nicht auf Ernährung oder Eiablage. In höheren Dosen allerdings wirkt es letal; 6 - 12 µg/ml behindern nicht das Verhalten und das Überleben. (10)

Auch der Flagellate *Euglena gracilis* Klebs. wurde auf seine Reaktion gegenüber STRM untersucht. (11)

STRM kann bei hoher Dosierung Nierenschäden verursachen und auch den 8 Gehirnnerven schädigen (Nervus vestibularis und N. acusticus). Mehrmonatige Gaben erzeugen beim Menschen, wie auch beim Versuchstier, Gleichgewichtsstörungen, Taubheit und andere Schäden. (12)

Ein Curare-ähnlicher Effekt des STRM und auch des NEOMYCIN in der Form eines Curare-formen Blocks kann bei der neuromuskulären Transmission ausgelöst werden. (13)

Streptomycin inhibiert das Wachstum von *Australorbis glabratus*. (14) Diese Studie über die Effekte des Streptomycin führte zu der Annahme, daß es auch einen Effekt auf die Eclosion von *Australorbis glabratus*-Eiern haben würde.

Streptomycin inhibiert das Schlüpfen. Befruchtete Eier eines bestimmten Stammes erhielten Streptomycin allein, 100 µg/ml, Streptomycin 100 µg/ml + 100 i.E. Penicillin und Penicillin, 100 i.E. allein. Kontrollen ohne Zusatz. Inkubationsdauer 4 Tage bei 27 - 28° C. Das Penicillin beeinträchtigt die Schlüpftrate nicht, das Streptomycin in differenten Salzlösungen hingegen inkubiert das Schlüpfen.

Australorbis glabratus ist in verschiedenen Stadien ihres Lebenszyklus sensitiv für Streptomycin. (15)

Wenn 1 000 Einheiten Streptomycin auf die Chorio-Allantois-Membran des Hühnerembryos placiert werden, so können im Blut noch nach 12 Stunden 6 - 10 E./ml aufgefunden werden. (16)

Streptomycin inhibiert die spontane Aktivität des isolierten Ratten-Uterus in situ und auch die Kontraktion des Kaninchen- und Ratten-Uterus. (17)

Streptomycin erzeugt am Mittelohr des Meerschweinchens eine Zunahme der Schäden, die auch als "Streptomycin-Schäden" in der Literatur bekannt sind. Aber warum diese Schäden auftreten, ist weitgehend unbekannt. (18)

Das Streptomycin besitzt eine akute Toxizität, wenn es intravenös und intracisternal appliziert wird. Dabei kommt es zu clonisch-tonischen Konvulsionen. (19)

Die orale Toxizität ist geringer, da eine niedrige Absorption durch den gastro-intestinalen Trakt erfolgt. Mit großen Dosierungen löst Streptomycin = 100-200 mg/kg Körpergewicht (KG) einen graduellen Abfall des arteriellen Blutdrucks aus. Mit Dosen von 200 - 400 mg/kg KG wird der Effekt irreversibel, der Blutdruck fällt auf weniger als 10 - 15 mm Hg. Am isolierten Froschherz nimmt bei 1,25 mg eines Streptomycin-Calcium-Chlorid-Komplexes/ml Ringer-Lösung die Amplitude der aurikulären und ventrikulären Kontraktion ab. Hohe Dosen von 150 mg/kg Streptomycin senken die Atmung. Dieses Merkmal ist das erste Zeichen einer Streptomycin-Intoxikation.

Die neurotrophen Effekte des Streptomycins bilden die charakteristischste pharmakodynamische Eigenschaft dieses Antibiotikums; zuerst beobachtet beim Menschen und später an Tieren. Diese Effekte werden bei Tieren durch wiederholte subcutane, intramuskuläre und intravenöse Injektion von 50 - 400 mg/kg KG erzeugt. Katzen, Hunde und Affen erscheinen sensitiver zu sein, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse am geringsten empfindlich.



Die einzige signifikante Differenz zwischen Streptomycin und Dihydrostreptomycin (DHSTRM) ist ihre relative Neurotoxizität. DHSTRM ist um 50 % neurotoxischer als Streptomycin. (20)

Katzen erhielten 14 - 127 Tage Streptomycin in großen Dosen. Bei allen Tieren traten ein postrotatorischer Nystagmus und eine Ataxie auf. Histologisch fanden sich bei den Tieren degenerative Veränderungen an den Sinnesepithelien der Crista ampullaris und der Macula utriculi. Die Sinneszellen waren abgeflacht und die Tragzellen an die Basis verlagert. (21) Am sensorischen Epithel des Labyrinths finden sich Störungen und Veränderungen. (22)

Tierexperimentelle Untersuchungen an graviden Meerschweinchen zeigten: 1. Der Übertritt von Streptomycin vom Muttertier auf den Foeten ist bei einer Dosis von 200 mg/kg, 2 x pro Tag, nur gering. 2. Hohe tägliche Dosen von 100 mg/kg und mehr führten in 8 - 10 Tagen zum Abort. Die Foeten sind mazeriert. 3. Am deutlichsten und am stärksten ausgeprägt findet sich die Antibiotika-Wirkung an der Placenta.

Einmalige Dosen von 100 mg/kg führen zur Hyperämie, Blutungen und kleinen hämorrhagischen Nekrosen, die bei weiteren Gaben schnell an Umfang zunehmen. (23)

Wurde Streptomycin am Kaninchen intravenös in die Ohrvene, 15 mg/kg KG, in die Nähe der Aorta femoralis an der Beugeseite des Knies 15 - 30 mg/kg KG, sowie intrathekal 5 mg/kg KG verabreicht, so waren histologisch in der Leber zentrolobuläre Nekrosen, eine Erweiterung der Disseschen Räume mit Füllung durch seröse Flüssigkeit und periportale Infiltrationen mit Lymphozyten und Retothelien zu beobachten, in den Nieren eine schwere parenchymatöse und fettige Degeneration, Hyperämie der Glomerulusschleifen und extrakapillare Blutungen und Exudation. Gesunde Gefäße wurden nicht angegriffen. Der Befund an Leber und Niere mahnt zur Vorsicht, bei der Therapie von Patienten mit Leber- und Nierenschäden. (24)

Meerschweinchen erhielten Streptomycin-Mengen von 6 - 30 g/kg KG. Die Degeneration der Sinneszellen ist von einem Verlust der Sinneshaare begleitet. An den geschädigten Cristae ampullaris eine aufsteigende Degeneration der peripheren Fasern des Nervus vestibularis. Veränderungen im Schneckenbereich des Cortischen Organs. Pathologische Veränderungen der Stria vascularis. Im Zentralnervensystem aller Tiere wurden am Boden des 4. Ventrikels und im Nukleus ventralis cochlearis vereinzelt Gliaknötchen und Degenerationen von Ganglienzellen histologisch nachgewiesen. (25 und 26)

Toxische Nebenerscheinungen der Streptomycin-Therapie, die Ausfallerscheinungen von Seiten des Vestibularis- und Cochlearis-Apparats, nehmen auch bei einer Arbeit über die Streptomycin-Therapie der Meningitis einen breiten Raum ein. (27)

Bei der Katze gibt es durch Dihydrostreptomycin schwere Gewebsveränderungen, wie sie auch früher schon bei Streptomycin-Verabreichung gefunden wurden, Pyknose und Zellverlust. (28)

## Literaturverzeichnis : Diskussion. 3) STREPTOMYCIN

- (1) CHERNIN, E.  
and SCHORK, A. : Effects of streptomycin on the  
hatching of Australorbis glab-  
ratus eggs. Exp. Parasit. 9, 9-13  
(1960)
- (2) WRIGHT, M. I. : Ototoxicity : A consideration  
of routes and mechanisms of  
hair cell damage associated  
with certain antibiotics and  
diuretics. Proc. Roy. Soc. Med.  
66, 189-194 (1973)
- (3) WATANUKI, K.  
and MEYER ZUM  
GOTTESBERGE, A. : Toxic effects of streptomycin  
and kanamycin upon the sensory  
epithelium of the cristula ampul-  
laris. Acta Otolaryng. 72, 59-67  
(1971)
- (4) VAKAET, L. : Etude expérimentale par la mé-  
thode des cultures organes des  
réactions de l'épithélium bron-  
chial de l'embryon de poulet.  
Arch. Anat. microsc. 45, 48-64 (1956)
- (5) SPOENDLIN, H. : Acute streptomycin intoxication  
of the labyrinth. Table ronde.  
Acta oto-laryng. (Stockh.) 63,  
Suppl. zu Nr. 2/3, 26-38 (1967)
- (6) MATSUURA, S.  
IKEDA, K.  
FURUKAWA, T. : Ouabain and streptomycin : Their  
different loci in action on  
saccular hair cells in goldfish.  
Science 160, 1117-1119 (1968)
- (7) GOLDBERG, I. E.  
and BELOVA, I. P. : Functional and morphological  
changes in kidney of dogs after  
parenteral administration of  
Streptomycin. Antibiotiki 13,  
1076-1082 (1968)

- (8) DĄBROWSKI, Z. : The influence of penicillin and streptomycin on the growth and development of frog tadpoles *Rana esculenta* L. and *R. temporaria* L. Acta biol. cracov. Sér. Zool. 3, 173-194 (1961)
- (9) SWAIN, H. H. : Action of certain antibiotics on the isolated dog heart.  
KIPLINGER, G. F. : J. Pharmac. exp. Therap. 117, 151-159  
and BRODY, Th. M. (1966)
- (10) TURNER, J. C. : Effects of antibiotics on *Daphnia*  
and LANNON, Th. J. : Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 684-688  
(1952)
- (11) VAVRA, J. : The action of streptomycin on the flagellate *Euglena gracilis* Klebs.. Fol. biol. (Praha) 2, 351 - 355 (1956)
- (12) FRIMMER, M. : Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen. F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 1971
- (13) BEZZI, G. : Neuromuscular blocking action of  
and GESSA, G. L. : some antibiotics. Nature 184, 905-906 (1959)
- (14) CHERNIN, E. : Studies on the biological control of schistosome-bearing snails. VII. Streptomycin-induced inhibition of growth and reproduction in the snail *Australorbis glab.* Am. J. Hyg. 66, 321-330 (1957a)

- (15) CHERNIN, E. Effects of streptomycin on the  
and SCHORK, A.R. : hatching of *Australorbis glab-*  
ratus eggs. *Exp. Parasitol.* 9, 9-13  
(1960)
- (16) LEE, H. F. A chick embryo technic for intra-  
STAVITSKY, A. B. venous and chemotherapeutic  
and LEE, M. P. : studies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*  
61, 143-149 (1946)
- (17) DZOLJIC, M. Action of streptomycin on the  
and BABIC, M. : uterus. *Europ. J. Pharmacol.* 2,  
123-126 (1967)
- (18) FEDERSPIEL, P. : De l'augmentation de l'ototoxi-  
cité Streptomycinique par les  
processus de l'oreille moyenne.  
*Ann. Oto-Laryng.* (Paris) 91, 41-49  
(1974)
- (19) MUSHETT, C. W. Pathologic changes resulting  
and MARTLAND, H. S. : from the administration of strep-  
tomycin. *Arch. Path.* 42, 619-629  
(1946)
- (20) MOLITOR, H. Pharmacology and toxicology of  
and GRAESSLE, O. E. : antibiotics. *J. Pharmac. Exp. Therap*  
98/II, 1-60 (1950)
- (21) BERG, K. : The toxic effect of streptomycin  
on the eighth cranial nerve.  
*Histol. invest.* A Prelim. report.  
*Ann. Otol.* 58, 448-456 (1949)
- (22) BERG, K. : The toxic effect of streptomycin  
on the vestibular and cochlear  
apparatus. An experimental study  
on cats. *Acta Oto-Laryng. Suppl.* 97  
, Oslo 1957

- (23) RISKÆR, N. The toxic effects of streptomycin  
CHRISTENSEN, E. and HERTZ, H. : nancy. Acta thc.scand.(Kobenh.)  
27,211-216 (1952)
- (24) MOSONYI, L. Über die Wirkung des Streptomycin  
IASZLO, J. auf gesunde Gewebe.  
ZULIK, R. Schweiz.Z.allg.Path.16,245-253  
and PERO, C.S. : (1953)
- (25) RUEDI, L. Weitere Befunde über die toxische  
FURRER, W. Wirkung von Streptomycin und  
GRAF, K. Chinin am Gehörgang des Meer-  
LÜTHY, F. schweinchens. Bull.Schweiz.  
NAGER, G. Akad.Med.Wiss.3/4,276-294 (1951)  
und TSCHIRREN, B. :
- (26) gleiche Autoren : Further observations concerning  
the toxic effects of strepto-  
mycin and quinine on the audi-  
tory organ of guinea pigs.  
Laryngoscope 62,333-351 (1952)
- (27) TERRIER, G. : Contribution au problème de la  
pathogénie et de la localisation  
des troubles cochléaires et vesti-  
bulaires survenant au cours du  
traitement à la streptomycine.  
A propos de 3 cas de méningite  
tuberculeuse. Schweiz.Arch.Neurol  
72,331-361 (1953)
- (28) WINSTON, J. Toxic effects of dihydrostrepto-  
LEWEY, F.H. mycin upon the central vesti-  
PARENTEAU, A. bular mechanism of the cat.  
SPITZ, E.B. Ann.Otol.62,121-129 (1953)  
and MARDEN, Ph.A. :

- (29) NEUNDÖRFER, B. : Medikamentös bedingte neurologische und muskuläre Störungen.  
Med.Welt.24,676-679 (1973)



## KANAMYCIN

Die Morphologie der Nierenschäden durch KM am Kaninchen und Hund wurde bei Tagesdosen von 5, 20 und 200 mg/kg und einer Experimentdauer von 7 - 10 Tagen verfolgt. Es wurden mäßige Veränderungen am Nierenepithel vorgefunden, die aber nach Aussetzen der Applikation weitgehend regeneriert werden konnten. (1) Die Toxizität des KM ist etwas geringer als die des STRM. Im Tierversuch verursachen hohe KM-Dosen toxische Nephrosen mit Nekrosen der Tubusepithelien. Bei Nierenexplantaten in der Kultur treten die gleichen Effekte auf. (2) Für Tiere sind 100 mg/kg/Tag nicht toxisch, 100 - 200 mg führen zum Anschwellen der Tubuli der Nekrose. Dosen über 200 mg/kg rufen eine Albuminurie, Haematourie, Azotämie und Anurie hervor, verbunden mit einer mittelbar folgenden Tubulusnekrose. (3)

Bei der Inhalation von KM, 6,58 µg/h und 3,52 µg/g durch Ratten wurden in den Lungen- und Nieren-Homogenisaten eine Absorption und eine Retention festgestellt. (4) Bei unseren Untersuchungen wurde eine deutliche Retention einer stark lichtbrechenden Substanz in den Lungen- und Nierenzellen eruiert.

Auch ein anderer lebenswichtiger Prozeß wird durch KM inhibiert. Die Proteinsynthese wird unterbrochen. Eine Verhinderung dieses optimal lebensnotwendigen Prozesses führt auch zur Nekrose. (5)

Diesen Untersuchungen stehen andere gegenüber, die eine zufriedenstellende Toleranz von KM-Aerosolen durch Tiere feststellten. Die Verdickungen der interalveolären Wände nach 20 und mehr Inhalationen waren reversibel, es war eine normale Reaktion der Lunge auf einen inadäquaten Reiz. (6)

Die Furcht vor der Überdosis des KM und der Erzeugung von Nebenwirkungen durch Metaboliten auf den Hörnerven führt oft zur Entwicklung von resistenten Stämmen der Mikroorganismen. (7)

Die durch KM hervorgerufenen Schäden an den Ganglienzellen sind unspezifisch und stehen in keinem ursächlichen Zusammenhang mit den Schäden an der Haarzellen des Corti-schen Organs.

Die Schäden an den Tubulusepithelien weisen ein ähnliches Bild auf, wie es an den Haarzellen des Corti-schen Organs beschrieben wurde. (8)

Die akute Toxizität des KM ist verhältnismäßig gering. Die DL 50 wurde an der Maus bei i.p. Injektion mit 1679 mg/kg und bei i.v. Injektion mit 316 mg/kg und bei s.c. mit 1648 mg/kg angegeben. (9)

Beim Tierversuch ergaben sich bei hohen Dosen über einen längeren Zeitraum Hörschäden und Nierenstörungen. (9)

Die Konzentration des KM in der Niere und Leber von Versuchstieren finden sich im Knochen und im Herzmuskel. (10)

In die Zerebrospinalflüssigkeit geht bei Hunden nach parenteraler Applikation das KM nur langsam über. (9)

Die DL 50 wird nach anderer Quelle mit 225 mg/kg und sogar mit 450 - 900 mg/kg angegeben. (11 und 11a)

Bei s.c. Verabreichung erzielten andere Autoren sogar Werte um 1850 - 2700 mg/kg. (12)

Alle basischen Antibiotika sind ausgeprägte Neurotoxica, mit einer besonderen Affinität zum VIII. Hirnnerven.

Bei Ratten treten nach Verabreichung von je 300 mg/kg KG in 3 aufeinanderfolgenden Tagen schwerste Nierenveränderungen auf; Nekrose der Tubulusepithelien und feinkörniges Zusammensinken des Zellprotoplasmas. (13)

Auch nimmt das KM einen Einfluß auf die intrauterine Entwicklung des Embryos bei Albinoratten. Ähnlich wie beim embryonalen Hühnerexplantat wird auch bei den embryonalen Ratten der Hörapparat und die Nieren nachhaltig geschädigt. (14)

Je höher die Tagesdosis, je größer die Gesamtmenge, desto ausgeprägter zeigen sich Störungen am Nervus acusticus. (15)

In einer Studie über die Effekte einiger Streptomyces-

Antibiotika auf die Cochlearis des Meerschweinchens rangieren die Antibiotika nach ihrer wachsenden Toxizität: NEOMYCIN, KANAMYCIN und STREPTOMYCIN. (16)

Der Foetus der Ratte zeigte keine großen fetalen Mißbildungen nach Gabe von Kanamycin an trächtige Tiere und auch keine Unterschiede im Gewicht zwischen den Kontrollen und den Versuchstieren. (17)

Das Enzym Phosphotransferase konnte als Modifikator des Aminoglykosid-Antibiotikums Kanamycin gefunden werden. (18)

Das Aminoglykosid-Antibiotikum Kanamycin agiert mit der 30 S Untereinheit. Es inhibiert am Peptid gebundene Formationen. Im Falle von Kanamycin wird das P 10 - Protein in eine inhibitorische Aktion mit einbezogen. (19)

Nach hohen Dosen oder längerer Anwendung insbesondere bei gestörter Nierenfunktion kann es zu Oktavus-Schäden und passageren Nierenstörungen kommen. (20)

Meerschweinchen, die mit ototoxischen Antibiotika = Kanamycin, Paromomycin und Neomycin behandelt wurden, zeigten eine rapide Abnahme aller elektrischen Potentiale der Cochlea bis zum vollständigen Verschwinden. (21)

Literaturverzeichnis : Diskussion 3) KANAMYCIN

---

- (1) ZAK, F.  
ZASTAVA, V.  
MALEK, P.  
und KOČVARA, S.

Morphologie der Nierenschädigung durch die Antibiotika Momycin und Kanamycin.  
: ref. Zbl. path. Anat. 103, 419-420 (1962)
- (2) KINOSHITA, Y.  
YAMASAKU, F.  
TAKEDA, H.  
USUDA, Y.  
and KITAHARA, K.

Nephrotoxicity of kanamycin with a combination of plasma expander. Biochemical studies of antimicrobial drugs. Sixteenth Symp. Soc. Gen. Microbiology, Cambridge 1966, Vol. I., pp. 586-590
- (3) NAKAZONO, M.  
NAIDE, Y.  
and OHKOSHI, M.

Biochemical studies on nephrotoxicity of kanamycin.  
: 16th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge 1966, vol. I, pp. 591-596 (1966)
- (4) TESKE, R. H.  
and MILLER, St. B.

Pulmonary absorption and retention of kanamycin after repeated inhalation administration of kanamycin aerosols. Appl. Microbiol. 19, 583-585 (1970)
- (5) NISHIMURA, T.  
TANAKA, N.  
and UMEZAWA, H.

Inhibition of protein synthesis by kanamycin.  
: J. Antibiot. (Tokyo) 15, 210-215 (1962)
- (6) PROKHOROVA, I. I.  
EIDELSHTEIN, S. T.  
and BEREZINA, E. K.

Experimental studies on kanamycin aerosols.  
: Antibiotiki 13, 1115-1118 (1968)

- (7) NOONE, P. Simple, rapid method for assay of  
PATTISON, J. R. aminoglycoside antibiotics.  
and SAMSON, D. : Lancet 1971, 16-19
- (8) ISHII, T. Lysosomal enzymes in the inner-  
ISHII, D. ears of kanamycin-treated guinea  
and BALOGH jr, K. : pigs. Acta oto-laryngol. (Stockh.)  
65, 449-458 (1968)
- (9) TISCH, D. E. Pharmacological studies with  
HUFTALEN, J. B. kanamycin.  
and DICKISON, H. L. : Ann. N. Y. Acad. Sci. 76, 44-65 (1958)
- (10) KUNIN, C. M. Absorption of orally administered  
CHALMERS, T. C. neomycin and kanamycin : with  
LEEVEY, C. M. special reference to patients  
SEBASTYEN, S. C. with severe hepatic and renal  
LIEBER, Ch. S. disease. New Engl. J. Med. 262,  
and FINLAND, M. : 380-385 (1960)
- (11) LAGLER, F. Zur Pharmakologie und Verträglichkeit von Kanamycin.  
OSTERLOH, G.  
und MÜCKTER, H. : Med-Welt 29/30, 1518-1523 (1960)
- (11a) LAGLER, F. Studies on the pharmacology of  
OSTERLOH, G. kanamycin. Antibiotics Annual,  
and MÜCKTER, H. : 1959-1960, 882-867
- (12) MAEDA, K. Studies on kanamycin.  
UEDA, M. J. Antib. Ser. A, 10, 228-231 (1957)  
YAGISHITA, K.  
KAWAJI, S.  
KONDO, S.  
MURASE, M.  
TAKEUCHI, T.  
OKAMI, Y.  
and UMEZAWA, H. :
- (13) STAEMMLER, M. Über Wirkungen des Kanamycins auf  
und DUDKOWIAK, V. : die Nieren. Med. Welt 24, 1296-1299  
(1961)

- (14) PERLMAN, D. Antibiotic control of contamination  
and BRINDLE, S.A. : in tissue cultures.  
Antimicrob. Ag. Chemother. p.458-461,  
(1963)
- (15) TYBERGHEIM, D. : Influence of some streptomyces  
antibiotics on the cochlear micro-  
phones in the guinea pig.  
Acta Oto-laryng. (Stockh.) Suppl.  
171, (1962)
- (16) FRIEDMAN, I. : The Ear.  
Chapter 11, pp.521-547, in WILLMER,  
E.N. : Cells and Tissues in Culture  
", vol.2. Academic Press, London  
New York, 1965
- (17) BEVERLANDER, G. The effect on the rat foetus of  
and COHLAN, S.Q. : transplacental acquired tetra-  
cycline. Biol. Neonatorum 4, 365  
- 370 (1962)
- (18) DAVIES, J. Mechanism of drug resistance.  
BREZINSKA, M. R-factors : Biochemical mechanisms  
and BENVENISTE, R. : of resistance to aminoglycoside  
antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci.  
182, 226-233 (1971)
- (19) PESTKA, S. : Inhibitors of ribosome functions.  
Ann. Rev. Biochem. 40, 697-710 (1971)
- (20) siehe (13)
- (21) MARSEILLAN, R.F. The effect of prolonged administra-  
and CORRADO, A.P. : tion of high doses of Rifampicin  
on the cochlear and vestibular  
apparatus. Arzneim.-Forsch. 24, 793  
- 795 (1974)

## GENTAMYCIN

Die klinische Bedeutung eines Antibiotikums ist abhängig von dessen wirksamer Konzentration am Infektionsort. Die Verteilung und Ausscheidung von GM in den verschiedenen Körperflüssigkeiten des Hundes, im Urin und der Thoraxlymphe wurde nach einer einmaligen Injektion von GM untersucht. GM wird schneller resorbiert. Der Höchstwert im Serum wird nach 30 - 60 Minuten erreicht. Nach 2 Stunden war der Serumspiegel auf die Hälfte der Höchstwerte abgefallen.

Bei allen Versuchstieren war das GM 5 Stunden nach der Injektion praktisch völlig aus Serum und Lymphe verschwunden. (1)

Die akute Toxizität (DL 50) des GM wurde an der Maus bestimmt und mit NEOMYCIN und KANAMYCIN verglichen. GM erwies sich bei verschiedenen Applikationsformen als nur etwa halb so toxisch wie NEOMYCIN. Im Vergleich mit Kanamycin war GM i.p. und s.c. sechsmal und i.v. achtmal toxischer. (2 und 2a)

Die DL 50 für das KANAMYCIN liegt im Gegensatz zum GM bei 15 mg/kg Körpergewicht. (3)

Bei Verträglichkeitstests an der Haut und Schleimhaut von Kaninchen wird diese als gut bezeichnet. (4)

Zu den bisherigen Angaben müssen noch einige hinzugefügt werden, die sich als unbedingt erwähnenswert herausstellten. An Modellinfektionen an weißen Mäusen wurde die therapeutische Wirksamkeit des GM untersucht. Nach s.c. Injektion wird 30 Minuten später die maximale Blutkonzentration erreicht. GM läßt sich innerhalb von 24 Stunden nach Injektion in verschiedenen Organen von Versuchstieren nachweisen, am höchsten ist der Gewebespiegel in den Nieren. (5)

Keine toxischen Effekte wurden bei Ratten beobachtet, die GM-Sulfat in der Dosierung von 20 mg/kg und über 24 Tage erhielten, bei Katzen in der Dosierung von 10 mg/kg und Tag über 40 Tage und bei Hunden, die 5 mg/kg über 50 Tage



erhielten. Erst bei höheren Dosen kam es bei den Versuchstieren zu Beeinträchtigungen des Gleichgewichts und der Nierenfunktion. (6)

Für den Menschen wird 0,8 - 1,2 mg/kg und Tag auf drei Einzelgaben verteilt als therapeutische Dosis angegeben. (7 und 7a)

Bei der Otitis externa des Hundes werden GM-Zubereitungen lokal angewendet. Bei Infekten des Harnweges wird es direkt in die Harnblase instilliert. GM wird von Hunden gut vertragen. (8)

Beim Meerschweinchen zerstört GM die Haarzellen des CORTI-Organes in Dosen von 110 mg/kg. (9a, 9b und 9c) Wurde GM i.v. oder i.p., 20 - 100 mg/kg Kaninchen und Ratten injiziert, so konnte festgestellt werden, daß GM den Blutdruck reduzierte. Kein Effekt auf das EKG bei 20, 40 und 60 mg/kg bei den Ratten und Kaninchen, lediglich eine leichte Bradykardie wurde beobachtet. 100 mg/kg i.v. war toxisch, induzierte einen negativen Chromotropismus, kardiale Depression und auch den Tod. Sehr hohe Dosen erzielten neuromuskuläre Depressionen. (10)

Am Affen wurde experimentell die Ototoxizität des GM festgestellt. Von der Species *Saimiri scuricus* wurden pro Tier 20, 30 oder 600 mg/kg/Tag s.c. oder 50 und 80 mg/kg/Tag i.m. injiziert. Je höher die Dosis von GM war, desto eher traten die Gleichgewichtsstörungen auf. Der optokinetische, neurale Weg bei den angegebenen Dosen wurde nicht angegriffen, aber die pathologischen Veränderungen entsprachen einer tubulären oder glomerulären Degeneration. (11)

Auch bei Katzen wurde eine lokale Ototoxizität festgestellt. (12)

Der Effekt des GM auf die renale Funktion wurde an Hunden untersucht, eine einfache Dosis von 10 - 80 mg. Die "glomerular filtration rate" ging nach Anwendung zurück, aber die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant, so daß die Nephrotoxizität des GM bei Hunden nicht bewiesen werden konnte. (13)

Die Wirkung der Aminoglykosid-Antibiotika auf die Nierenlysozyme wurde bei der Ratte untersucht. In Dosen von 0,5, 1, 5, 15 und 50 mg/kg wurden die Antibiotika STREPTOMYCIN, NEOMYCIN und GENTAMYCIN appliziert. Bei allen vier Antibiotika sind die renalen Lysozyme erhöht. Die Möglichkeit einer End-Produkt-Hemmung des Lysozyms ist auf Grund dieser Resultate zu erwägen, und dabei könnte eine Beziehung zu der Nephrotoxizität dieser Antibiotika herzustellen sein. (14)

Die charakteristischen Merkmale der Nephrotoxizität des GM wurden weiterhin untersucht. GM wurde s.c. in verschiedenen Dosen Ratten über 5 Tage injiziert. Mit GM begannen die Veränderungen mit 100 mg/kg. Auf Grund der Ergebnisse auch mit den anderen Antibiotika KANAMYCIN und NEOMYCIN wird angedeutet, daß der Terminus Nephrotoxizität doch möglich wäre, denn GM steht in der Mitte zwischen beiden. (15)

Im menschlichen Organismus wird die Substanz des GM nicht metabolisiert. Ein Teil wird durch die Galle, der Rest durch glomeruläre Filtration exkretiert, und die Substanz findet sich nicht denaturiert im Urin wieder. (16)

An neugeborenen Ratten können extensive Läsionen mit tubulärer Nekrose durch tägliche Dosen von 100 mg/kg provoziert werden. 25 mg/kg täglich werden gut toleriert. (17)

Bei Tieren wird wenig oder kein biologisch aktives GM durch den Gastrointestinaltrakt absorbiert. Hohe Dosen von 25 - 100 mg/kg produzieren beim Hund Nephrotoxizität und bei der Katze vestibuläre Disfunktion. (18)

GENTAMYCIN ist, wie alle verwandten Antibiotika derselben Gruppe, bedingt vestibulotoxisch. Es bewirkt bei hohem Blutspiegel degenerative Erscheinungen an den sensorischen Zellen des Vestibularapparates. Im Tierversuch treten dort zuerst Veränderungen auf; Veränderungen im Cochlea-Apparat erscheinen viel später. Im Tierversuch Schädigungen des 8. Hirnnerven.

Nierenschäden wurden im Tierversuch bei Antibiotika-Mengen beobachtet, die um zwei Zehnerpotenzen über den therapeutisch angewandten Dosen lagen. (19)

Es sind bisher durch GENTAMYCIN oto- und nephrotoxische Symptome beobachtet worden, sowohl tierexperimentell als auch beim Menschen. (20)

Die Ototoxizität des GM wurde an Katzen untersucht. Dabei erreicht das Antibiotikum das innere Ohr durch die "round window membran". (21) Die Ototoxizität des GM wurde auch an Affen untersucht. Die pathologischen Schäden an der Niere wurden als tubuläre Degeneration und auch als glomeruläre Schäden gefunden. (22)

Die Sulfatsalze der Aminoglykosid-Antibiotika KANAMYCIN, NEOMYCIN, GENTAMYCIN und STREPTOMYCIN inhibieren die renalen Lysozyme in vitro. Die gesamten renalen Lysozyme wurden durch die Aminoglykosid-Antibiotika erhöht, am stärksten durch Neomycin und Kanamycin. Die Möglichkeit einer End-Produkt-Repression des Lysozyms könnte in Betracht gezogen werden, um diese Ergebnisse zu erklären. (23)

Der Effekt des GENTAMYCIN auf das Myocard und neuromuskuläre Verbindungen wurden an der Ratte und Kaninchen studiert.

100 mg/kg i.v. war toxisch für Kaninchen. 20, 40 und 60 mg/kg i.v. bei Ratten und Kaninchen erzeugten eine leichte Bradycardie. Hohe Dosen von Gentamycin bedingen an der neuromuskulären Junction eine Depression der Transmission (24) Die Möglichkeit einer Nephrotoxizität wird diskutiert.

An Hunden wurde der Effekt des GENTAMYCIN auf die Nierenfunktion von Hunden studiert. Aber bei diesen Untersuchungen konnte eine Nephrotoxizität bei Hunden, wohlgemerkt, nicht festgestellt werden. (25)

Die Ototoxizität der Aminoglykosid-Antibiotika ist für die Praxis wichtig. Bei parenteraler Anwendung von Streptomycin, Dihydrostreptomycin, von Gentamycin und Neomycin

können ototoxische Schäden auftreten. Die Ototoxizität beruht nicht auf einer spezifischen Organtoxizität sondern auf pharmako-kinetischen Gegebenheiten. In der Perilymphe werden sehr hohe Konzentrationen erreicht und die Halbwertszeit in der Perilymphe ist viel länger als im Blut. Der primäre Angriffspunkt liegt in den Sinneszellen der Cochlea und des Labyrinths. Neomycin und Gentamycin sind stärker ototoxisch als Streptomycin und Kanamycin. (26)

Aber ein bestimmtes Antibiotikum vermag auch nur gewisse Sinnesepithelien bevorzugt zu schädigen. Dihydrostreptomycin schädigt vor allem die Haarzellen des Cortischen Organs, Streptomycin vor allem die vestibulären Sinneszellen. (27)

Beim Versuchstier ist Gentamycin toxisch auf das Innenohr und toxischer als Kanamycin und Streptomycin. Es bewirkt eine Degeneration der Mitochondrien der sensorischen Zellen bis hin zu einer Zellnekrose. Bei Ratten, deren Nierenfunktion intakt ist, ist Gentamycin bei hohen Dosen bis 200 mg/kg Körpergewicht nephrotoxisch. Es wurden Tubulärnekrosen beobachtet. (28)

Die Ototoxizität des Gentamycins wurde durch die Überprüfung des Corti-Organes vom erwachsenen Meerschweinchen erbracht. 50 mg/kg Körpergewicht (KG), 80 mg/kg KG zeigen in der Morphologie keinen Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren. Bei 110 mg/kg KG beginnt die Degeneration der inneren Haarzellen, bei 140 mg tritt eine Destruktion des Corti-Organes und eine Degeneration der äußeren Haarzellen ein. (29)

An insgesamt 300 Meerschweinchen, denen 1 x 2, 5, 10, 20, 50 und 100 mg Gentamycin subcutan verabreicht worden war, wurde die Pharmakokinetik des Gentamycins in Liquor und in der Augenflüssigkeit bestimmt. Die Gentamycinspiegel in Liquor, Kammerwasser und Glaskörper waren von der angewandten Einzeldosis abhängig und die Gentamycin-Maximalwerte im Liquor ebenso wie im Serum bereits nach 45 Minuten bis 1 Stunde s.c. Injektion erreicht worden. (30)

Embryonale, diploide Lungenfibroblasten vom menschlichen Foeten erhielten das Gentamycin in Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  und 500  $\mu\text{g/ml}$ . Die letzten beiden Konzentrationen waren toxisch. Eine Langlebigkeit der Zellen nahm bei 10  $\mu\text{g/ml}$  zu. Aber diese Untersuchungen in Kultur wurden vom Autor als nicht ganz ausreichend bezeichnet. (31)

Gentamycin ist - wie die anderen Aminoglykosid-Antibiotika - ein oto- und nephrotoxischer Wirkstoff. Dies wurde besonders an Meerschweinchen festgestellt. Tägliche Dosen von 2 x 25 mg und 2 x 100 mg GM/kg KG. Der Preyer-sche Ohrmuskelreflex diente zur Prüfung der Hörfunktion. Die Schäden sind durch Degeneration der Haarzellen in den einzelnen Windungen nach GM beträchtlich. (32)

Die Liquorgängigkeit des GM wurde an Hand von Untersuchungen aufgezeichnet, in der den Meerschweinchen einmal 50 mg GM bzw. 100 mg GM/kg KG subkutan verabreicht worden war. Zwischen dem Liquorspiegel und dem Serumspiegel besteht eine Parallelität, beide sind linear von der verabreichten Einzeldosis abhängig. (33)

Eine einmalige intramuskuläre Gabe von 80 mg GM wird beim Menschen innerhalb von 12 Tagen, mikrobiologisch nachweisbar, ausgeschieden. An Organen von Mäusen und Hunden wurde nach einem Depot für GM gesucht. In der Nierenrinde fanden sich Konzentrationen bis zu 200  $\mu\text{g}$ .

Noch 10 Tage nach der letzten Injektion wurden 0,2  $\mu\text{g/ml}$  ausgeschieden. Die Konzentrationen in Herz, Leber und Milz lagen bei 0,3 bis 2,8  $\mu\text{g/g}$ , in der Lunge zwischen 0,4 bis 7,1  $\mu\text{g/g}$ , in den Nieren allerdings zwischen 10 und 50  $\mu\text{g/g}$ . 10 Tage nach der letzten GM-Gabe wurde noch eine renale Konzentration von 2,0  $\mu\text{g/g}$  gefunden. In den Nierenrinden fanden sich Konzentrationen von 80 bis 200  $\mu\text{g/g}$  mit nur geringer Konzentrationsabnahme bis zum 16. Tag nach der Applikation. Hinweise auf eine toxische Nierenschädigung bestanden nicht. (34)

Die Anwendung an GM an gesunden Ratten erzeugte charakteristische dosis-abhängige funktionelle und anatomisch-feststellbare Veränderungen an den Nieren. Dosen geringer als 1 mg/kg und Tag bildeten zahlreiche lysosomale "Cytosegresomes" (autographic vacuoles), die myeloide Körper enthalten. Bei 10 mg/kg/Tag wurden die obigen Schäden zusammen mit einer tubulären Nekrose beobachtet. Bei höheren Dosen (20 mg/kg/Tag) trat eine ausgeprägte Tubular-Nekrose mit einer breiten Akkumulation von myeloiden Körpern, innerhalb der tubulären Wandzellen und den tubulären Lumina, auf. Die funktionelle Beeinträchtigung bestand in einer Polyurie und massiven tubulären Nekrosen. Massive Tubular-Nekrosen, Oligurie und Tod in einer Urämie sind die Folge einer Dosis von 40 mg/kg/Tag.

Die Ergebnisse indizieren, daß GM dosis-bezogene renale Schäden erzeugt, bei Dosen, die mit denen vergleichbar sind, die beim Menschen zur Therapie verwendet werden. Die nach GM-Dosen auftretenden prominenten myeloiden Körper in lysosomalen Cytosegresomen des renalen Tubulus-Epithels scheinen ein empfindlicher Indikator der Gentamycin-Toxizität zu sein. (35)



Literaturverzeichnis : Diskussion 3) GENTAMYCIN

- (1) CHISHOLM, G.D. Distribution of Gentamycin in  
CALNAM, J.S. body fluids. Brit. Med. J. 1968/II,  
WALTERSWORTH, P.M. Nr. 5596, pp. 22-24  
and REIS, N.D. :
  
- (2) HEPDING, L. Experimentelle Untersuchungen  
und WAHLIG, H. : über ein neues Antibiotikum,  
Gentamycin. Arzneim.-Forsch. (Drug  
Res.) 16, 1-11 (1966)
  
- (2a) WAHLIG, H. : Antibakterielle Wirksamkeit von  
Gentamycin. Therap. Gegenw. 105,  
1401-1416 (1966)
  
- (3) WEINSTEIN, M.J. : Experimental background and bac-  
teriology of Gentamicin.  
Gentamicin-First Intern. Symp.  
Paris, p. 9 (1967)
  
- (4) KUTZSCHE, A. Zur Verträglichkeit einer Genta-  
und VÖGE, H.O. : mycin-Creme.  
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 16,  
11-14 (1966)
  
- (5) DIMITROW, D.I. : Study of some chemotherapeutic  
and pharmacological properties  
of gentamicin. Antibiotiki 10,  
1019 + (1965)
  
- (6) BLACK, J.B. Pharmacology of gentamicin, a new  
CALESNICK, B. broad spectrum antibiotic.  
WILLIAMS, D. Antimicrob. Ag. Chemother. 3, 138  
and WEINSTEIN, M.J. : - 147 (1963)
  
- (7) NAUMANN, P. Zur antimikrobiellen Therapie  
and HUBMANN, R. : urologischer Infektionen.  
Der Urologe 7, 16-23 (1968)



- (7a) NAUMANN, P. : Erwünschte und unerwünschte Wirkungen moderner Antibiotika-Therapie. Therapiewoche 21, 1445-1448 (1971)
- (8) FÜRSTER, D. Testungsergebnisse und erste klinische Erfahrungen mit Gentamycin beim Hund.  
MÜLLER, L. F. und DIENEMANN, O.: Berl. u. Münch. Tierärztl. Wschr. 82, 264 - 268 (1969)
- (9a) WRIGHT, I. : Investigation of ototoxicity of an antibiotic from *Micromonospora purpurea* (Gentamicin). J. Path. 98, 129-136 (1969)
- (9b) WRIGHT, I. : OTOTOXICITY. Proc. Roy. Soc. Med. 66, 189-192 (1972)
- (9c) WRIGHT, I. Electrolyte disturbances induced by D'SOUZA, S. Gentamicin administration in the and MCGILL, J. : guinea pig. IRCS Intern. Res. Commun. Syst. March, 1973
- (10) BOHYARD, P. Etude expérimentale de l'action neuro-  
BALANSARD, P. musculaire et cardiovasculaire d'une  
BISMAR, M. C. antibiotique aminoglucosidique, la  
FAURE, F. gentamycine. C. R. Soc. Biol. 164, No. 8-9,  
JADOT, G. 1802-1805 (1970)  
et MARSEILLES, Fr.:
- (11) LUNDQUIST, P. G. Experimental ototoxicity of genta-  
ALFORD, B. R. micin in squirrel monkeys.  
and MIYATA, H. J. Infect. Dis. 124, Suppl. pp. 114-124  
IGARASHI, M. : (1971)
- (12) WEBSTER, J. C. Ototoxicity of topical gentamicin  
CAROLL, R. in the cat.  
BENITEZ, J. T. J. Infect. Dis. 124, Suppl. pp. 138-144  
and MCGEE, T. M. : (1971)
- (13) SCHULTZE, R. G. Possible Nephrotoxicity of Gentamycin.  
WINTERS, R. E. J. Infect. Dis. 124, Suppl. 445-447 (1971)  
KAUFFMAN, H. :



- (22) IGARASHI, M. Experimental ototoxicity of gentamicin in squirrel monkeys.  
LUNDQUIST, P.G. J. Infect. Dis. 124, Suppl. pp. 114-124  
ALFORD, B.R. : (1971)  
and MIYATA, H.
- (23) EUDY, W.W. Effects of aminoglycosides on  
and BURROUS, S.E. : renal lysozyme in rats.  
Biochem. Med. 6, 419-425 (1972)
- (24) BOUYARD, P. Etude expérimentale de l'action  
HALANSARD, P. neuro-musculaire et cardio-  
BIMAR, M.C. vasculaire d'un antibiotique  
FAURE, F. aminoglucosidique, la gentamycine.  
et JADOT, G. : C. R. Soc. Biol. 164, 1802-1805 (1970)
- (25) SCHULTZE, R.G. Possible nephrotoxicity of  
WINTERS, R.E. Gentamicin.  
KAUFFMAN, H. : J. Infect. Dis. 124, Suppl. 445-447  
(1971)
- (26) HAWKINS, J.E. Comparative tests of Gentamycin  
JOHNSON, L.G. ototoxicity.  
and ARAN, J.M. : J. Infect. Dis. 119, 417-426 (1969)
- (27) KELLERHALS, B. : Zur Ototoxizität der Aminoglyko-  
sid-Antibiotika.  
Münchn. Med. Wschr. 115, 1667-1672  
(1973)
- (28) BUSSIEN, R. : La gentamycine, approche théorique.  
Méd. et Hyg. 28, 504-507 (1970)
- (29) WRIGHT, I. : Investigation of ototoxicity of  
an antibiotic from Micromonospora  
purpurea (Gentamicin),  
J. of Pathol. 98, 129-136 (1969)
- (30) FEDERSPIEL, P. : Experimentelle Untersuchungen zur  
Pharmakokinetik des Gentamycins  
in Liquor und Augenflüssigkeit.  
Arzneim.-Forsch. 24, 808-814 (1974)

- (31) LITWIN, J. : The effect of commercial and pure gentamycin on the growth of human diploid lung fibroblasts. Acta. path. microbiol. scand. Sect. B. 78, 273-276 (1970)
- (32) FEDERSPIEL, P. : Morphologische Untersuchungen von Gentamycin und Tobramycin. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 1739-1745 (1973)
- (33) FEDERSPIEL, P. Über die Liquorgängigkeit des Gentamycins. Versuchsergebnisse beim Meerschweinchen. Ärztl. Praxis 24, 510 + (1972)
- (34) WAHLIG, H. Gentamycin ohne toxischen Effekt in  
BERGMANN, R. Nierenrinde kumuliert.  
BREUER, J. 8. Intern. Congr. of Chemotherapy.  
HAMEISTER, W. ref. Medical Tribune, 8, p. 17 (1973)  
METALLINOS, A.  
und WEISSE, G. :
- (35) KOSEK, J. C. Nephrotoxicity of Gentamycin.  
MAZZE, R. I. Labor. Invest. 30, 48-57 (1974)  
and COUSINS, M. J. :

## TETRACYCLINE

Aber nicht nur in der Kultur, auch am embryonalen und erwachsenen Tier wurde die Antibiotika-Wirkung untersucht. Die Toxizität der Tetracycline wird an den folgenden Untersuchungen klar: Das Aureomycin, in Dosen von 125 mg/kg/Tag subcutan bei der Maus injiziert, unterbrach vollständig eine bestehende Trächtigkeit. (1)

Die TETRACYCLINE werden angemessen, aber unvollständig, vom Gastro-Intestinal-Trakt absorbiert. Die Hauptnebenwirkungen bestehen aus der Retention in den Eingeweiden. Nausea, manchmal auch Diarrhoe, sind wahrscheinlich ein direkter Effekt der Substanz auf die gastrische Mukosa. Modifikationen der intestinalen Flora wurden beobachtet. TETRACYCLINE werden in den Zähnen deponiert, während der frühen Stadien der Verkalkung. In utero kann es geschehen, wenn die Mutter nach dem 5. Schwangerschaftsmonat mit TETRACYCLINEN behandelt wird. Dann beginnt die Kalzifikation der Zähne. (2 und 3)

TETRACYCLINE, in exzessiven Dosen appliziert, können zum Leberschaden führen, sichtbar dargestellt an den Leberkulturen, die nach TETRACYCLINE-Anwendung Schäden der Zellen aufwiesen, die von einer Hemmung bis zur Nekrose führten.

Die renale Toxizität ist abhängig vom Status der renalen Funktion. Photosensibilisierungen an der Haut können auftreten. TETRACYCLINE können die Blutkoagulation verzögern. (4)

Die Nebenwirkungen des AUREOMYCINS, des TERRAMYCINS und des ACHROMYCINS treten besonders an den Schleimhäuten und im Intestinaltrakt auf. (5)

Die "mode of action" der TETRACYCLINE agiert mit der Protein-Synthese. Die TETRACYCLINE blockieren die Bindung des Transfer-RNA-Aminosäure-Komplexes an das Ribosom. (6)

Dadurch kann keine Aminosäure an die Messenger-RNA und keine Polypeptide können gebildet werden. (7)

Steigende Konzentrationen von TETRACYCLINEN können in kutanen und internen malignen Tumoren gefunden werden, (8) in nekrotischem Gewebe (9), in Abszessen (10), in Knochen (11) und in den Zähnen (12). Nicht nur der TETRACYCLIN-Gehalt, auch der OXYTETRACYCLIN-Gehalt der Haut vom Menschen wurde festgestellt (13) und die Verteilung über den ganzen Körper des Kaninchens (14).

Eine effektive Verteilung von TETRACYCLINEN in der Haut nach oraler Anwendung der Antibiotika wird berichtet. Sowohl TETRACYCLIN als auch DEMETHYL-CHLORTETRACYCLIN wurden in signifikanter Menge in der normalen Haut gefunden. In Dermatitis-Bezirken war das Antibiotikum zentralisiert, merkwürdigerweise nicht in der umgebenden normalen Haut. (15)

Die schon durch TETRACYCLINE erzeugten Arzneimittel-Nebenwirkungen an der Haut wurden bereichert durch die Einführung des DEMETHYL-CHLORTETRACYCLINS (Ledermycin<sup>R</sup>). Es erzeugt Haut-Eruptionen (15 a) und Lichtdermatosen, bedingt durch photochemische Besonderheiten dieser Substanz. (16)

Das ALPHA-6-DESOXYTETRACYCLIN (DOXYCYCLIN) (DNC) auch als Vibramycin<sup>R</sup> bekannt, wurde aus dem OTC mehrstufig synthetisch hergestellt. Dieses Präparat soll eine erhebliche Einschränkung der Gefahr der Ablagerung des Wirkstoffes im Zahnapparat und in den Knochen erbringen. (17) Die akute Toxizität (LD<sub>50</sub>) bei der Maus:

|            | DNC        | OTC         |
|------------|------------|-------------|
| oral       | 1650 mg/kg | 3800 mg/kg  |
| intravenös | 244 mg/kg  | 202 mg/kg . |

DNC wird stärker resorbiert als OTC. Wiederholte tägliche Gaben hatten Gelbfärbung von Knochen und Zähnen zur Folge.

Die Schilddrüse verfärbte sich ebenfalls. Die Verfärbung der Knochen und der Zähne, die auf die Bildung eines TETRACYCLIN-Calcium-Phosphat-Komplexes zurückgeführt

wird, die Schilddrüsen-Anfärbung und die Deponierung von TETRACYCLIN im Leberparenchym des Hundes müssen unter dem Aspekt gesehen werden, daß DCN viel stärker resorbiert wird als andere TETRACYCLINE. (18)

In vivo-Untersuchungen mit Mäusen zeigen, daß DCN gegenüber anderen Tetracyclinen eine höhere antimikrobielle Aktivität besitzt. Die Toxizität ist geringer, erst bei Dosen, die 50 mal höher als die therapeutischen Gaben waren, fanden sich bei Affen und Hunden reversible Störungen im Gastro-Intestinal-Bereich. Hamster und Ratten tolerierten bis zu 500 mg/kg ohne irgendwelche Schäden. (18)

Das PYRROLIDINO-METHYLTETRACYCLIN (PMTC) REVERIN<sup>R</sup> übertrifft die Löslichkeit des TETRACYCLINS um das 2 500-fache. Die Löslichkeit hängt nicht von der Wasserstoffionen-Konzentration des Mediums ab. Untersuchungen über die örtliche Wirkung intracutan injizierter PMTC-Lösungen auf die lokale Verträglichkeit der Substanz an der Bauchhaut des Kaninchens, bei Mäusen und Meerschweinchen lagen bereits vor (19) als die Untersuchungen über die örtliche Wirkung intracutan injizierter PMTC-Lösungen unterschiedlicher Konzentration an der Oberarm-Haut von 34 Probanden durchgeführt wurden. (20) Die überwiegende Zahl der Probanden entwickelte erythemato-papulöse Effloreszenzen. Ein Gewebeschaden kam als Folge einer toxischen Reaktion durch Denaturierung von Serumproteinen durch PMTC-Lösung zustande. Diese Lösungen haben wahrscheinlich im Bindegewebe der Haut eine Eiweiß-Denaturierung verursacht.

Das METHACYCLINE (MTC) (RNDOMYCIN<sup>R</sup>) ist ein semisynthetisches Derivat des OTC, ohne Nebeneffekte. (21)

Es zeigt sogar stärkere antimikrobielle Aktivität als Tetracyclin. Das MTC besitzt eine besondere Affinität zu Lungengewebe. Diese Reaktion wurde bei den vorliegenden Untersuchungen sowohl an embryonalen Lungengeweben als auch an anderen Epithelien nachgewiesen. Es war nicht genau zu eruieren, ob man hier von einer spezifi-



schen "Gewebsaffinität" oder "Organspezifität" des Antibiotikums sprechen soll. (22)

Die perkutane Absorption von antibakteriellen Substanzen, hier den Tetracyclinen, liegt weit unter denen des PENICILLINS = 1,52 %, Tetracycline 0,34 % . (23)

Am Intestinum der Maus wurden nach Tetracyclin-Dotation gleiche Effekte erzielt wie beim Menschen. (24)

Wurden trächtige Mäuse mit Tetracyclinen behandelt, so abortierten 10 %. Erhielten Mäuse täglich 125 mg/kg AUREOMYCIN während der ersten 2 - 6 Tage der Trächtigkeit, so war die Häufigkeit der Fehlgeburten von der Behandlungsdauer abhängig. Erstreckte sich die Behandlung über 4 oder mehr Tage, so wurde keine Frucht ausgetragen. Ein Progesterondefizit verhindert die Implantation. (25 und 25a)

Wenn Hunde eine i.p. Injektion von OTC erhielten, so zeigten die Beinknochen eine für Tetracycline typische gelbe Fluoreszenz. (26)

Leberschäden können durch TETRACYCLINE induziert werden. Eine einmalige i.p. Gabe von TCM in subletaler Dosis, 250 mg/kg, führt zur Verfettung der Rattenleber. Die Dilatation und Vesikulation des endoplasmatischen Retikulums und die Quellungen der Mitochondrien sind die auffälligsten Veränderungen, die der Verfettung der Leberzellen vorausgehen. (27)

Die Elimination der TETRACYCLINE erfolgt hauptsächlich durch die Nieren.

Auch an Versuchstieren finden wir Reaktionen, die mit denen in der Kultur vollwertig vergleichbar sind.

Am Hund wurde die Gewebeverteilung von TCM und OTC eruiert. (28 und 28a) Bei der Ratte wurde die Trächtigkeit durch TETRACYCLIN, das den Abort herbeiführte, unterbrochen. (29)

In der Nachkommenschaft von Ratten, die in der Gravidität Tetracycline mit dem Futter erhalten hatten, traten häufig Wachstumsstörungen und Mißbildungen auf. (30)

Konzentrationen von OTC wurden in der Cortex, Medulla und Papilla der Hundeniere gemessen; es zeigten sich Unterschiede je nach dem Antibiotikotyp. (31)

Die Aufnahme von markiertem Tetracyclin in die Skelettmuskulatur könnte die Theorie erlauben, daß Calcium und Polypeptide für die Fluoreszenz des TETRACYCLINS benötigt würden. (32)

Küken vom Huhn, Türkenhuhn, junge Schweine und Ratten waren als Versuchstiere ausgewählt worden. An sie wurde CTC und OTC verfüttert: Dosis 10 mg/kg Körpergewicht. Der Hühnerembryo wird in seiner Entwicklung gehemmt. (33)

Die männlichen und weiblichen Tiere der Reismotte, *Corcyra cephalonica* STAINT., standen unter Terramycin-Einfluß. Die Männchen wurden unter TERRAMYCIN (TCM)-Einfluß 8,3 % schwerer als die weiblichen Tiere. (34)

Albinoratten wurde durch i.m. Injektion 15 mg/100 g Körpergewicht gegeben. 4 Stunden später getötet, da zu dieser Zeit die Konzentration in der normalen Leber am höchsten ist. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zu den normalen Leberzellen festgestellt. (35)

Die gelbe Fluoreszenz nach Tetracyclingaben wurde zur Feststellung der Verteilung in den einzelnen Körpergeweben angewandt. (36)

Nach i.m. und i.p. Injektion wurde das TCM in höchster Konzentration in der Leber und der Niere gefunden. (37)

Neben diesen beiden Hauptfundorten wird TCM auch in den endokrinen Drüsen von Wistar-Ratten gefunden. Hier besonders in der Nebenniere, der Zirbeldrüse und der Hypophyse. Die Nuklei der Nebennieren bleiben dunkel, weil sie kein TCM speichern. (38)

Innerhalb von 30 Minuten nach i.p. Injektion kann man eine diffuse gelbe Fluoreszenz an der Oberfläche der Knochen von Ratten beobachten. Breiter in der Nähe der Epiphyse. Diese Methode ermöglicht es uns, das Längen- und Breitenwachstum der normalen Tibia festzustellen. (39)

Der Einfluß des AUREOMYCINS und des REVERINS auf weibliche Küken und Hähnchen wurde nach der folgenden Methodik ausgeführt:

2 Tage-Küken erhielten AUREOMYCIN im Futter, die Hähnchen, 10 Wochen alt, 11 - 17 mg/Tier/Tag und REVERIN, 10 mg/kg KG/Tag i.m. .

Es sollte die Veränderung der Pankreasinseln untersucht werden. Sowohl kurzfristige als auch langdauernde perorale Applikation therapeutischer Dosen von CTC stimulierten signifikant das Pankreas-Insel-System. Das Verhalten des Nebennierenmarks war uneinheitlich, deutet aber auf eine Intervention der Tetracycline hin. (40) Wurden Lebermikrosomen von Ratten mit Chlortetracyclin (CTC) "Aureomycin" behandelt, so konnte man eine Abnahme des Lebergewichts durch Reduzierung des mikrosomalen Proteingehalts feststellen. Das bedeutet, daß CTC bei der mikrosomalen Proteinsynthese inhibierend eingreift. (41) Eine direkte Abnahme des Lebergewichts bzw. des Gewichts der Leberexplantate haben wir nicht festgestellt. Bei uns war die Inhibition der Zellproliferation an den Explantaten auffallend.

Der Metabolismus der TCM-Antibiotika wurde beim Hund und bei der Ratte durch die Verwendung von markiertem Antibiotikum eruiert. Ein signifikanter Teil der Antibiotika wird als Chelat-Tetracyclin an das Skelett der Tiere gebunden. 90 % des markierten Antibiotikums wird durch die Harnorgane oder durch die Fäces eliminiert. (42)

Erwachsene Ratten erhielten i.p. 50 mg/ml wässrige Lösung und oral 25 mg/ml wässrige Lösung. Durch chemische und radiochemische Methoden konnte ein kumulativer Effekt bei den Tieren beobachtet werden, die unter einer Langzeit-Drogen-Diät standen. Einmalige i.v. oder i.p. Applikation induziert eine Retention als sofortige Konsequenz auf den Kontakt des Antibiotikums mit dem Knochen. (43)

AUREOMYCIN wird 4 Stunden nach oraler Anwendung unabsorbiert im Gastro-Intestinal-Trakt von Hunden wiedergefunden. Nach 6 Stunden wurde kein Antibiotikum mehr im Magen entdeckt, wenig im kleinen Intestinum, 58 % im großen Intestinum. (44)

Orale Dosen von 6 - 800 mg/kg AUREOMYCIN und Terramycin wurden Ratten und Meerschweinchen appliziert. Das Serum-niveau der Substanzen wird bestimmt. Die Dosisanhebung ergibt keinen proportionalen Anstieg in der Serumkonzentration. (45)

Auf die Leberregeneration hat CTC i.v. angewandt einen Hemmeffekt, denn es inhibiert die Zunahme der Thymidin-Aktivität in der 24 Stunden-Regenerations-Leber der Ratte. Der Effekt ist dosisbezogen und wurde begleitet von einer Depression der DNA-Synthese und der der Thymidin-Synthese-Aktivität. Nukleare DNA wurde nicht inhibiert. (46)

Bei Hunden, Kaninchen und auch beim Menschen werden TCM sofort nach oraler und parenteraler Anwendung absorbiert. Die höchste Konzentration des TCM, die im Serum von Tieren gefunden wurde, setzte orale Indikation voraus. (47) Bei Ratten, 1 g/Tag, und Menschen (2 g/Tag) wurde AUREOMYCIN oral und i.p. angewandt. Bei Hunden und Ratten ergab es nach einer Applikationsdauer von 70 Tagen und bei 3 gesunden jungen Männern keine Änderungen im Leber-Funktions-Test. (48)

Der Teleostier, *Lebistes reticulatus*, als Guppy-Fisch bekannt, erhielt 20 % Aureomycin im Futter; eine merkbare Inhibition der somatischen Entwicklung und des Wachstums waren die Folge. (49)

Auch an jungen Ratten wurde AUREOMYCIN-HCl mit 2 mg/g Futter auf diese Methode erprobt. Folge der Anwendung des Antibiotikums war ein merkbarer Anstieg des Gewichtes, mit keinem signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. (50)

An Kaninchen konnte gezeigt werden, daß TCM bei i.v. Injektion einen additiven Effekt zu einer partiell-lähmenden Dosis von d-Tubocurarin besitzt. (51)

Der inhibierende Effekt des TCM auf Säugetierspezies und Säugetiergewebe besteht in der schon oft genannten Hemmung der Proteinsynthese, sowohl bei Säugetieren, bei Säugetiergewebe-Explantaten als auch bei Bakterien. (52)

Die Wirkung der TETRACYCLINE auf die Entwicklung und Vermehrung der Schwarzen Bohnenblattlaus, *Apis fabae* Scop., wurde nach Besprühung mit 0,2 %-iger Lösung der TMN, AMN, TCM und PCN geprüft. Die Population wurde durch TMN am meisten reduziert. Die Fruchtbarkeit der 1. Generation war um 97 % vermindert und in der 2. Generation folgte völlige Sterilität. Die Entwicklung der Larven war um 1 Tag verzögert. Gewicht und Größe der behandelten Aphiden waren wesentlich geringer als bei den Kontrollen, Nahrungsaufnahme und Exkretion waren reduziert. (53)

Die Schilddrüsenfunktion wird nach Antibiotika-Gaben bei Eintagsküken, 5 mg/kg/Tag und einmal 500 mg/kg KG durch erhöhten Jodeinbau stimuliert, wird aber nicht durch die Antibiotika direkt stimuliert, sondern durch die Wachstumsbeschleunigung, ausgelöst durch die Antibiotika-Gabe. (54)

Die quantitative Verteilung des TETRAMYCINS in normalen Zellen, Geweben und Organen wurde in den letzten 20 Jahren hinreichend untersucht. Die Verteilung von Tritium-markiertem TETRACYCLIN in subcellulären Fraktionen von normalen und neoplastischen Mikrosomen-Fractionen von Ratten wurde intensiv studiert. Der größte Teil des injizierten Tetracyclins wurde in der Mikrosomen-Fraktion gefunden. Tumorgewebe nahm mehr markiertes Material auf als normales Gewebe. (55)

Es wurden Kaulquappen von Erdkröten, *Bufo vulgaris*, in 1 Liter Brunnenwasser unter gleichen Kulturbedingungen gehalten.

Pro Liter gab es eine Zugabe von 500 mg OTC/ 1 Liter Wasser. TCM und OTC unterbanden Wachstum und Metamorphose. Aureomycin erwies sich in der Dosis von 500 mg/Liter als sehr toxisch, 200 mg/l verhinderten das Wachstum, beschleunigten aber die Metamorphose. (56)

Wistar-Ratten erhielten während der Gestation 150 - 200 mg Tetracyclin-HCl täglich. Die Jungen waren alle normal, aber das spätere Wachstum wurde bei 10 % verzögert.



Erhielten die Ratten bereits intrauterin oder für 28 Tage post partum die obige Dosis, so war die Länge der Beine um 15 % kürzer als bei den Kontrollen. (57)

Transplacental erworbenes Tetracyclin wird in dem fetalen Skelett deponiert, und seine Lokalisation im wachsenden Knochen manifestiert sich in einer charakteristischen Fluoreszenz. Die Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten deuten auf eine spezies-differente Sensitivität gegenüber der Droge hin. (58)

AUREOMYCIN s.c. injiziert zu 125 mg/kg/Tag bei der Maus, unterbricht vollständig die Trächtigkeit, wenn die Behandlung bis mindestens 4 Tage vor der Nidation aufrechterhalten wird. Wenn die Behandlung erst nach der Implantation vonstatten geht, dann provoziert das Tetracyclin 10 - 50 % Aborte. (59 und 59 a)

Spricht man von dem Einfluß der Tetracycline auf die Leber, dann wird in erster Linie die Verfettung genannt; Wistar-Ratten erhielten täglich mit der Schlundsonde Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Demethyltetracyclin. Tägliche Dosis ist anfänglich 50 mg/100 g Körpergewicht. Oxy- und Demethyltetracyclin rufen eine mäßige, Chlor- und reines Tetracyclin eine beträchtliche Verfettung der Leber hervor. Die Lebern dieser Tiere nehmen im Vergleich zu denen der unbehandelten Kontrollen an Gewicht ab. Ein beträchtlicher Eiweißverlust der Lebern ist auffallend. Die Verfettung ist Ausdruck einer Fettspeicherung durch Hemmung oxydativer Vorgänge. Der Eiweißverlust der Leber spricht für eine Eiweißkatabole Wirkung der Tetracycline. Oxy- und Demethyltetracyclin rufen eine wesentlich geringere Fettspeicherung der Leber hervor, bedeuten aber für den Gesamtorganismus eine stärkere Belastung. Tetracyclin und Chlortetracyclin werden trotz stärkerer Fettspeicherung ohne sonstige Störungen vertragen. (60)

Tetracyclin induziert tubuläre Nekrose in den Nieren von Ratten bei gleichzeitiger Hämoglobinurie und haben damit einen direkten nephrotoxischen Effekt des Tetracyclins

erzeugt. Wurden mit einer Dosis von 15 mg/100 g Körpergewicht Tetracyclin mit i.v. Injektion an 90 weibliche Wistar-Ratten gegeben, gibt es keine signifikante Ischämie der Niere nach der Anwendung der Tetracycline.

Die Autoren haben demonstriert, daß die experimentale Nekrose der Nierentubula der Ratte, durch andere chemische Substanzen hervorgerufen, durch Tetracycline nicht noch gesteigert wurde. (61) Die Wirkung von Tetracyclin auf die Entwicklung des Skelettsystems beim Hühnerembryo wurde experimentell festgestellt. Tetracyclin-Hydrochlorid wird vom wachsenden Knochengewebe aufgenommen und gespeichert, wie es durch seine Fluoreszenz erkennen läßt. Embryonen (8 - 12 d Bebrütung) werden jeweils 0,1 - 5 mg Tetracyclin, gelöst in 0,1 cm<sup>3</sup> Aqua dest. in den Dotter injiziert. Nach 24 Stunden ist das Tetracyclin in den ossifizierten Skelettteilen deponiert. Bei Dosen zwischen 2,5 - 5 mg ergibt sich bei jüngeren Embryonen eine Verzögerung des Wachstums. (62)

Am experimentellen Modell des Hühnerembryos wurden Untersuchungen über die Verteilung und Absorption des Tetracyclins eruiert. Die Tetracycline zu 1 500 Einheiten/0,5 ml wurden in die Embryonen von 10 - 11 Tage bebrüteten Hühnereiern injiziert. Die größte Menge Tetracyclin wurde in der Allantois-Flüssigkeit gefunden. (63)

Das Antibiotikum Aureomycin hemmt Fermentsysteme tierischer Gewebe in Dosen von etwa 45,9 µg/ml zugesetzt, den Ablauf der Zellatmungsvorgänge im Bereich des Zitronensäurezyklus. (64) In dem Skelett bzw. den Geweben mit hohem Calciumgehalt werden Tetracycline abgelagert; bei verschiedenen Tierarten mit therapeutischen und subtherapeutischen Dosen. Die Ablagerung ist bedingt durch das Vermögen der Tetracycline, Chelate zu bilden. Diese Chelatbildung mit polyvalenten Kationen ist eine charakteristische Eigenschaft des Naphtacen-caramid-Kernes der Tetracycline.



Oxytetracyclin und Tetracyclin bilden Chelate, wenn auch nicht in gleicher Stärke. Nicht zu geringe Chelatmengen in den Knochen können im ultravioletten Licht fluoreszieren. (65)

Neben der Kultur ist der Tierversuch für die pharmazeutische Industrie von grundlegender Bedeutung, wenn auch auf dem Antibiotika-Sektor die Untersuchungen mit Geweben vom Menschen, die wohl am deutlichsten richtungsweisenden Versuche darstellen.

Sogar der Kohlehydratstoffwechsel kann durch Antibiotika beeinflusst werden. Weibliche Küken bzw. Hähnchen erhielten kurzfristig und auch als langandauernde orale Applikation therapeutische Dosen von Chlortetracyclin und 4-tägig intramuskuläre Injektionen von Methylyltetracyclin. Diese Dosen stimulierten signifikant das Pankreasinselsystem und damit sowohl die blutzuckersenkende als auch die hyperglykämisierende Komponente. Das Verhalten des Nebennierenmarks war uneinheitlich, deutete aber auf eine Intervention der Antibiotika hin. (66)

Leberveränderungen bei Ratten, 24 - 48 Stunden nach Verabreichung von Tetracyclinen, führten zum Exitus.

Ergebnis: herdförmige Leberzellschwellungen mit Plasmaplasmavakuolen. Am 7. Tag nach Applikation im Zellplasma basophile Körperchen, die manchmal Zellkerngröße überschritten. (67)

Sprague-Dawley-Ratten erhielten eine 1-%ige wässrige Lösung von 2,5 mg/100 kg eines Tetracyclin-Abbauproduktes = 12,5 % Anhydrotetracyclin, 23,7 % Anhydro-4-Epitetracyclin oder reines Tetracyclin intraperitoneal im 12-stündigen Abstand injiziert. 24 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Tetracyclin-Abbauprodukten (TA) tritt eine Nephropathie auf. Tetracyclin reichert sich in den Leber- und Nierenzellen an und hemmt in vitro die oxydative Phosphorylierung. Für andere Tetracyclin-Abbauprodukte wird ein gleichartiger jedoch erheblich stärkerer Effekt diskutiert. (68) Leberepithelverfettung mit Einzelzellnekrosen, Tubulusepithelnekrosen in der Niere

sind Zeichen einer Tetracyclin-Toxizität. Das Tetracyclin ist für die Entstehung der schweren Epithelnekrosen verantwortlich zu machen. (69)

Wistar-Albino-Ratten erhielten intravenös Anhydrotetracyclin 1 - 12 mg/100 kg. Ein großer Teil der Tiere starb. Histologisch ergaben sich Nekrosen im proximalen Tubulus contortus. (70)

Albino-Ratten erhielten Tetracyclin-HCl und Oxytetracyclin-HCl. Die Tetracycline werden durch den Adsorptionsprozeß an die Knochensubstanz gebunden, und zwar an deren Oberfläche. (71)

Männliche Wistar-Ratten erhielten Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Dimethyltetracyclin 50 - 150 mg/100 g KG über 6 Wochen verteilt. Es trat eine unterschiedlich intensive und ausgedehnte Verfettung der Leber auf, bei Chlortetracyclin und Tetracyclin erreichte die Verfettung ihre größten Ausmaße. Sie ist Ausdruck einer gehemmten Fettverarbeitung und Fettverwertung in den Zellen durch Drosselung der Phosphatidsynthese und des Zitronensäurezyklus. Der ebenfalls auftretende Eiweißverlust wird auf gleiche Vorgänge zurückgeführt. (72)

Während bisher immer festgestellt werden konnte, daß Tetracycline eine toxische Wirkung haben, zitiere ich nun eine ganz andere Meinung: Aureomycin hat keine Effekte am isolierten Kaninchen-Intestinum oder am Meer-schweinchen-Uterus. Beim Menschen konnten nach Einzel- und Wiederholungsdosierungen keine toxischen Effekte beobachtet werden. (73)

Auch beim Menschen konnten toxische Störungen an inneren Organen durch Tetracycline festgestellt werden: bei 5 von 103 Patienten fand sich eine Vakuolisierung und Fragmentation der Leberzellen neben autolytischen Veränderungen und fettiger Degeneration. (74)

Morphologische Befunde nach zeitlich verschiedenen Leberpunktionen, die während und nach der Behandlung mit Tetracyclinen gewonnen wurden, zeigten lediglich nach Aureo-

mycin-Medikationen reversible fettige Degenerationen der Leber. (75)

Mäuse und Hunde erhielten über sieben Tage intraperitoneal und subcutan und oral Dosen von 75 - 150 mg/kg KG Aureomycin in einer Lösung von aminoessigsäurem Natrium und verdünnter Salzsäure. Am 8. Tag wurden die Tiere getötet.

Kontrollen erhielten die Lösungsmittel ohne Antibiotika-Zusatz. An den Tierlebern zeigte sich nach Aureomycin-gabe im Leberparenchym eine zentrale Vakuolisierung und Verfettung. Der Grad der Veränderungen war abhängig von der Höhe der Dosis. Auch inaktiviertes Aureomycin rief die gleichen Zellveränderungen hervor. Weniger starke Veränderungen durch Terramycin und Chloramphenicol-Gaben.

(76) Tetracyclin wird als ein feiner Staub in normalen Leberzellen angesammelt. Tetracyclin ist in hohen Dosen toxisch für Leberzellen. Daneben trat bei den Untersuchungen die Tatsache hervor, daß Tetracyclin eine spezielle Affinität für Metall-Kationen besitzt. (77)

Leber und Niere geben nach intramuskulärer und intraperitonealer Injektion die höchsten Konzentrationen, auch besonders in einigen endokrinen Drüsen, u.a. Nebennieren, Schilddrüse und in der "pineal gland" (Zirbeldrüse). (78)

Bei der Knochenbildung und dem Wachstum der Osteoblasten wird hier besonders die Osteoblasten-Aktivität des Knochens der Tibia von Ratten und die Wirkung der Tetracycline eruiert. Der Knochen wächst noch nach der Applikation der Tetracycline weiter. Daher kann diese Methode zur Feststellung der Wachstumsrate von Knochen, den Basisprozessen der Knochenbildung unter normalen Bedingungen, der Knochenresorption unter normalen Bedingungen oder unter dem Einfluß von antibiotischen Substanzen und Hormonen Verwendung finden. (79)

1 500 Einheiten Tetracyclin wurden in Eier injiziert, die 10 - 11 Tage alten Hühnerembryonen enthielten. Das

Antibiotikum wurde in großer Menge in der Allantois-Flüssigkeit gefunden, aber ihre Höhe übertrifft niemals die Höhe der Antibiotika in den embryonalen Körperflüssigkeiten und im Gewebe. (80)

Primiparen Ratten wurden 150 - 200 mg/die Tetracyclin-HCl während der Gestation gegeben. Die Jungen waren im Gewicht normal, aber das spätere Wachstum war um 10 % verzögert. Werden Ratten intrauterin mit Tetracyclin behandelt, so war die Länge der Beine um 15 % reduziert als bei den Kontrollen. (81)

Transplacental erworbenes Tetracyclin wird im Skelett des Rattenfetus deponiert. Seine Lokalisation im wachsenden Knochen wird durch eine charakteristische Fluoreszenz manifestiert. Ein besonderer Effekt, der durch Tetracyclin verursacht wird, ist eine bemerkbare Reduktion in fetaler Gestalt und Gewicht. Die kritische Periode dieses Tetracyclin-Effektes auf das fetale Wachstum scheint zwischen dem 10. und 20. Tag der Gestation zu liegen.

Wurde Kanamycin bei trächtigen Ratten angewandt, so wurden keine fetalen Mißbildungen und keine Gewichtsunterschiede festgestellt. (82)

Tetracyclin, Chlortetracyclin und Dichlortetracyclin wurden embryonalen Hühnchen am 6. und 11. Lebenstag injiziert; je 1 mg für 6-Tage-Küken und 1, 2, 3 und 4 mg für 11-Tage-Küken. Injektion in die Allantois oder den Dottersack. Die Allantois-Injektion ergab höchste Tetracyclin-Konzentrationen in der Leber, der Lunge und im Serum der 11-Tage-Küken. (83)

Die Dynamik der Antibiotika-Konzentrationen in der Allantois-Flüssigkeit vom 9-Tage-Küken wurde untersucht. Die maximal tolerierten Dosen waren bei Penicillin 3260 i.E., Streptomycin 1440 i.E., Tetracyclin 2 mg, Oxytetracyclin 2 mg und Chlortetracyclin 2 mg. (84)

Sechs differente Tetracycline wurden unter Verwendung von Hühnerembryonen ausgetestet. Klinische Dosen, 18 Tage

angewendet, führten zu keiner signifikanten Mortalität unter den Embryonen, obwohl die Substanzen im Skelett erkannt wurden. Es konnten keine Veränderungen am Knochengengerüst aufgedeckt werden. Erst eine Erhöhung der Dosen auf das 10-fache brachte eine Interferenz mit dem Knochenwachstum und Abnormitäten konnten aufgedeckt werden. Mit Demethylchlortetracyclin waren die Abnormitäten signifikant größer als mit Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin. (85)

Die Permeabilität der placentalen Barriere und die Konzentration der Tetracycline im Fetus nehmen mit der Dauer der Trächtigkeit bei Ratten zu. An den fetalen Lebern und Nieren entwickelte sich eine Fettdystrophie, besonders im Leberparenchym und dem Epithel der Nierentubuli des Fetus. (86)

Der Effekt der Gewebeverteilung von Chlortetracyclin bestand in der Auffindung von  $C^{14}$  - markiertem Chlortetracyclin und Tritium-markiertem Tetracyclin 4,5 Stunden nach Injektion von 10 mg/kg bei Hunden. Die Antibiotika penetrieren in alle Gewebe, ausgenommen Fettgewebe. Die Penetration des Tetracyclins ist geringer als die des Chlortetracyclins. Auf eine Ähnlichkeit mit dem Demethylchlortetracyclin wird hingewiesen. (87)

Zu den Tetracyclinen, die in der ärztlichen Praxis verwendet und in der Klinik angewendet werden, gehören aber noch einige andere verwandte Derivate:

Das Pyrrolidino-methyl-tetracyclin "REVERIN-HOECHST" .

Bei Untersuchungen über den Metabolismus und die Gewebeverteilung eines markierten Demethylchlortetracyclins nach intravenöser Applikation beim Hund, 4 mg/kg, wurden nahezu 75 % der Radioaktivität im Urin wiedergefunden und 15 % in den Fäkalien. 93 % der Gesamtdosis waren nicht metabolisiertes Demethylchlortetracyclin. Das Antibiotikum wurde über den ganzen Körper verteilt, ausgenommen das Fettgewebe. (88)

Vier Tetracycline, Demethylchlortetracyclin (DMCT), Methacyclin (MC), Tetracyclin (TC) und Oxytetracyclin (OTC) wurden mittels Ultrafiltrations-Methode an Serum gebunden. Dabei wurden folgende Prozentzahlen für die einzelnen Substanzen ermittelt: DMCT : 90 %, MC : 89,9 %, TC : 64,8 % und OTC : 35,4 %. (89)

Die Wirkung der Antibiotika Terramycin, Aureomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und REVERIN auf die Entwicklung und Vermehrung der Schwarzen Bohnenblattlaus, *Aphis fabae* Scop., wurde untersucht. Frisch abgesetzte Larven wurden mit 0,2 %iger Lösung obiger Antibiotika besprüht. Am wirksamsten wird die Vitalität durch Terramycin reduziert. Die Fruchtbarkeit der 1. Generation wurde um 97 % reduziert, in der 2. Generation folgte vollständige Sterilität. Die Entwicklung der Larven verzögerte sich um einen Tag. Gewicht und Größe waren geringer als bei den unbehandelten Kontrollen.

Nahrungsaufnahme und Exkretion waren ebenfalls reduziert. Nur Terramycin bewirkte diesen Vitalitäts-reduzierenden Effekt, während alle anderen Antibiotika keinen Einfluß auf die Vermehrung und Entwicklung von *Aphis fabae* bewirkten. (90)

Das Problem der Einlagerung von Tetracyclinen in den Knochen erlangte größere Bedeutung als ursprünglich erkannt wurde, daß sie nicht nur deren Farbe verändern, sondern auch Störungen in der Entwicklung und im weiteren Wachstum hervorrufen können. Besonders häufig war ein Fehlen des Unterkiefers und eine Syndaktilie bei Ratten zu beobachten. Aber nicht nur an Ratten, auch am Menschen konnten diese Untersuchungen bestätigt werden, weil Kinder im frühesten Alter nach einer Tetracyclintherapie ihrer schwangeren Mutter oder in der Neugeborenen-Periode an dem durchgebrochenen Milchgebiß gelbe Schmelzverfärbungen aufwiesen. (91)



Sogar beim erkrankten Menschen wurden in Niere- und Prostata-Gewebe- und Serumspiegel etwa 3 Stunden nach der Applikation (iv) von 275 mg Reverin bestimmt. Störungen im Harnabfluß steigern den Antibiotikaspiegel im Nierengewebe. Eine weiter deutliche Verminderung ist bei zunehmender Beeinträchtigung der Durchblutung des Nieren- und Prostata-Gewebes festzustellen. (92)

Das N-pyrrolininomethyl-tetracyclin (Rolitetetracyclin) REVERIN wurde narkotisierten Hunden durch intravenöse Dotation verabreicht. Daneben wurden auch Oxytetracyclin und Doxycyclin zum Vergleich ausgetestet. An Katzen, Rhesusaffen und Ratten wurde auch REVERIN ausprobiert. Die Frage des Kreislauffeffektes stand zur Debatte. Beim Hund wiesen alle drei Tetracyclin-Derivate eine kardio-depressorische Wirkung auf, deren Ausmaß und Dauer von der Dosis und der Injektionsdauer abhängig war. Bei einer Dosis von 10 mg/kg intravenös gegeben in 5 - 10 Sekunden war jedoch der kardio-depressorische Effekt nach Oxytetracyclin und Doxycyclin stärker ausgeprägt als beim REVERIN. Bei allen Tetracyclin-Derivaten konnte eine Tachyphylaxie in der Reihenfolge Doxycyclin - Oxytetracyclin - REVERIN nachgewiesen werden. (93)



## MINOCYCLIN

Markiertes Minocyclin wurde für das Studium des Metabolismus dieses Antibiotikums an Ratten und nach einer intraperitonealen Injektion von 50 mg/kg und beim Hund nach intravenöser Injektion von 4 mg/kg an der exkretierten Radioaktivität gemessen. Über 80 % wurde in Form von Minocyclin oder dem Carbon-4- Epimer des Minocyclins ausgeschieden. Ein einfacher uncharakterisierbarer Metabolit konnte für die verbleibende Radioaktivität in Rechnung gestellt werden.

Über 95 % der Radioaktivität, ausgeschieden durch den Hund, wurden in Form des Minocyclin oder seines Carbon-4 Epimer gefunden. Die Verteilung von Minocyclin im Körper von Hunden nach der Administration von  $C^{14}$  markiertem Minocyclin ergab, daß Minocyclin in alle Gewebe penetriert. Wenn es mit anderen Tetracyclinen verglichen wird, ergibt sich, daß es nur in das Gehirn, Thyroides und das Fettgewebe penetriert. (94)

Die Grundlage aller pathologischen Zustände des Organismus nach Tetracyclin-Dotierung scheint ein antianaboler Effekt = Inhibition der Proteinsynthese durch die Tetracycline zu sein. (95)

Diese vorgelegten Untersuchungen wurden gerechtfertigt, durch eine Untersuchung über die Wirkung von Antibiotika und Sulfonamide in der Schwangerschaft. Der wichtigste Punkt ist die Plazenta-Passage und die fetale Toxizität. Antibiotika und Sulfonamide passieren die "placental barrier", gleiche Konzentrationen finden sich daher in maternalem und foetalem Serum. Penicillin, Tetracycline und Erythromycin scheinen nicht gefährlich für den Foeten, während die Aminoglykosid-Antibiotika - Streptomycin, Neomycin, Polymyxin und Bacitracin nur mit äußerster Vorsicht angewandt werden sollten.

Detoxikations-Mechanismen sind im Neugeborenen und auch im embryonalen Gewebe nicht vorhanden! (96)

Literaturverzeichnis : Diskussion 3) TETRACYCLINE

- (1) BOUCHER, D. : Propriétés abortives des tetracyclines chez la souris.  
Traitement hormonaux.  
Arch.Sci.Physiol.23,481-516 (1969)
- (2) RIEDEL, H. : Jatrogene Schäden in der Zahn-,  
Mund- und Kieferheilkunde durch  
Tetracyclin und Hydantoin.  
Zschr.Allgemeinmed.46,1342-1344  
(1970)
- (3) BICKEL, G. : Antibiothérapie.  
Méd.et Hyg.26,881-900;1392-1397  
(1968)
- (4) VERBOV, J.L. : Tetracyclines in Dermatology.  
The transactions St.John's Hosp.  
Dermatology Soc.vol.55,78-83  
(1969)
- (5) KIMMIG, J. : Erwünschte und unerwünschte  
Wirkungen moderner Antibiotika-  
therapie. Dtsch.Ärztebl.-Ärztl.  
Mitt.64,1159-1160 (1967)
- (6) LASKIN, A.I. : Tetracyclines.  
In GOTTLIEB, D. and SHAW, P.D.:  
Antibiotics, Mechanism of Action,  
vol.I, p.347 (1967) Springer-Verlag  
New York
- (7) LORIAN, V. : The mode of action of antibiotics  
on gram-negative bacilli.  
Arch.Intern.Med.128,623-632 (1971)

- (8) PHILLIPS, J.W. The deposition and retention of  
COBB, E.G. tetracycline in cancer.  
RICHARD, V. Am.J.Surg.100,384-388 (1960)  
RHODES, W.D.  
LOEHRER, D.C.  
and RITCHIE, J.L. :
- (9) MUSTAKALLIO, K.K. : Tetrasykliinein kartyminen  
nekrobioseihn.  
Duodecim 79,905-909 (1963)
- (10) LOCK, F.L. Distribution of tetracycline in  
LASKIN, D.M. the granuloma pouch.  
and ENGEL, M.P. : J.Pharmacol.Exp.Ther.141,131  
-138 (1963)
- (11) IBSEN, K.H. Differences among tetracyclines  
URIST, M.R. with respect to the staining  
and SOGNAES, R.F. : of teeth. J.Pediat.67,459-462  
(1965)
- (12) WITKOP jr., C.J. : Hypoplasia and intrinsic stain-  
and WOLF, R.O. ing of enamel following tetra-  
cyclyne therapy.  
J.Am.Med.Ass.185,1008-1011(1963)
- (13) GOULD, J.C. The tetramycin content or human  
and RITCHIE, H.D. : skin during therapy : A compa-  
rison with serum.and urine levels  
Brit.J.Plant.Surg.5,208 (1962)
- (14) WELCH, H.L. : Absorption, excretion and distri-  
bution of terramycin.  
Ann.N.Y.Acad.Sci.53,253-264(1950)
- (15) CULLEN, St.I. : Cutaneous pharmacology of the  
and CROUNSE, R.G. Tetracyclines. J.invest.Derm.45,  
263-268 (1965)

- (15a) DELANAY, T.J. : Tetracycline-induced fixed drug eruptions.  
Brit.J.Derm.83,357-358 (1970)
- (16) IPPEN, H. : Lichtbeeinflusste Arzneimittel-  
nebenwirkungen an der Haut.  
Dtsch.Med.Wschr.87,480-488 (1962)
- (17) DIMMLING, Th. : Bakteriologische Untersuchungen  
über Resorption und Exkretion  
sowie über das Wirkungsspektrum  
von Alpha-6-Deoxytetracyclin  
(Doxycyclin). Med.Klin.62,1269  
- 1276 (1967)
- (18) WINKLER, E. : Doxycyclin-Ergebnisse der Basis-  
und WEIM, H. : untersuchungen.  
Med.Klin.62,1257-1262 (1967)
- (19) HERGOTT, J. : Zur Pharmakologie des Pyrrolidino-  
und THER, L. : methyl-tetracyclins (Reverim),  
Münchn.med.Wschr.100,663-665 (196  
(1958)
- (20) TRITSCH, H. : Toxische Zwei-Phasenreaktion auf  
Pyrrolidino-methyl-tetracyclin.  
(Reverin<sup>(R)</sup>)  
Arch.klin.exp.Derm.234,229-241  
(1969)
- (21) CASSAU, D. : Klinische Erfahrungen mit Rondo-  
mycin. Dtsch.med.J.16,409-411  
(1965)
- (22) POLZ, E. : Besondere " Lungenaffinität " von  
und SCHMIEDEL, A. : Methacyclin ?  
Münchn.Med.Wschr.110,1651-1653  
(1968)

- (23) KNIGHT, A.G. The percutaneous absorption of  
VICKERS, C.F.H. antibacterial substances.  
and PERCIVAL, A. : Brit.J.Derm.81, Suppl.4, 88-91  
(1969)
- (24) ROSEN, H. Chlortetracycline and mouse  
EINHEBER, A. intestinal wall.  
BROWN, N.D. Nature(Lond.) 214, 671-674(1967)  
and WREN, R.E. :
- (25) BOUCHER, D. : Action de l'auréomycine sur  
l'implantation chez la souris.  
C.R.Soc.Biol.(Paris)162, 1150-115  
-1153 (1969)
- (25a) BOUCHER, D. : Propriétés abortives des tetra-  
cyclines chez la souris. Traite-  
ments hormonaux.  
Arch.Sci.Physiol.23, 481-516  
(1969)
- (26) BRUNI, M. Attivita antibiotica del tessu-  
MUZIE, E. to die animali trattati con  
PECORELLI, F. ossitetraciclina.  
e PITZURRA, M. : Ann.Slavo 2, 213-224 (1960)
- (27) DAMJANOV, I. Ultrastructure of acute tetra-  
and SOLTER : cycline induced liver change.  
Experientia 27, 1204-1205 (1971)
- (28) KELLY, R.G. Tissue distribution of tetracy-  
and KANEGIS, L.A. : cline and oxytetracycline in  
the dog. Toxicol.Appl.Pharmacol.  
11, 114-120 (1967)
- (28a) KELLY, R.G. Metabolism and tissue distribu-  
and KANEGIS, L.A. : tion of radioisotopically labe-  
led Minocyclin. Toxicol.Appl.  
Pharmacol.11, 171-183 (1967)

- (29) STEINER, G. Tetracycline induced abortion in  
BRADFORD, W. the rat.  
and CRAIG, J.M. : Labor. Invest. 14, 1456-1463 (1965)
- (30) MELA, V. Unterkieferdeformationen bei  
and FILIPPI, B. : Tetracyclintherapie.  
Minerva Stomat. 6, 307 (1957)
- (30a) FILIPPI, B. Congenital malformations of the  
and MELA, V. : face and of extremities caused  
by Tetracyclin. Min. Chir. (Tor.)  
12, 1106-1110 (1957)
- (31) WHELTON, A. Intrarenal distribution of Peni-  
SAPIR, D.G. cillin, Cephalotin, Ampicillin and  
CARTER, G.G. Oxytetracycline during varied  
KRAMER, J. states of hydration.  
and WALKER, W.G. : J. Pharmacol. Exp. Ther. 179, 419-428  
(1971)
- (32) DALE, E. Distribution of tetracycline in  
BAXLEY, J.B. subcellular components of normal  
SCUTCHFIELD, F.D. and tumor tissues of the albino  
and LEXINGTON, Ky. : rat. Experientia 24, 164-165 (1968)
- (33) TSCHERNOUK, A.M. The influence of some antibiotics  
and ALEXANDROV, P.N. : and chemotherapeutic drugs on the  
development of the embryo of the  
hen. II Ind Intern. Symp. Chemothera-  
py, Naples, 1961, vol. I, pp. 342-349  
(1963)
- (34) BHANU, D. : Different growth response of the  
male and female rice moth to anti-  
biotic supplement.  
Nature (Lond.) 197, 1227 + (1963)

- (35) TAPP,E. : Tetracycline accumulation in toxic  
and CAROLL,R. : liver damage.  
J.Path.Bact.89,715-721 (1965)
- (36) BÖTTIGER,L.E. : On the distribution of tetracycline in the body.  
Antibiot.Chemother.5,332-339(1955)
- (36a) BÖTTIGER,L.E. : On the distribution of chlortetracycline in the body.  
Acta Med.Scand.151,343-348 (1955)
- (37) TAPP,E. : Tetracycline accumulation in  
and CAROLL,R. : toxic liver damage.  
J.Path.Bact.89,715-721 (1965)
- (38) TAPP,E. : Tetracycline fluorescence in experimental lesions of the adrenal  
KOVACS,K. : gland. J.Path.Bact.91,241-247(1966)  
and CAROLL,R.
- (39) TAPP,E. : Tetracycline labelling methods of  
measuring the growth of bones in  
the rat.  
J.Bone Joint Surg.(1966)
- (40) GROTH,H. : Untersuchungen über die Wirkung  
einiger Antibiotika und eines Antidiabetikums auf die Nebennieren  
und die Langerhansschen Inseln des  
Pankreas beim Huhn.  
Zbl.Vet.-Med.7,702-714 (1960)
- (41) PETERS,M.A. : The inhibitory effect of Aureomycin (chlortetracycline).Pre-  
and FOUTS,J.R. : treatment on some rat liver microsomal enzyme activities.  
Biochem.Pharmacol.18,1511-1517  
(1969)



- (42) KELLY, R.G. Metabolism of tetracycline in  
and BUYSKE, D.A. : the rat and the dog.  
J. Pharmacol. exp. Therap. 130, 144  
- 149 (1960)
- (43) BUYSKE, D.A. Concentration and persistence  
EISNER, H.J. of tetracycline and chlortetra-  
and KELLY, R.G. : cycline in bone.  
J. Pharmacol. 130, 150-156 (1960)
- (44) GRAY, W.D. Aureomycin absorption and distri-  
HILL, R.T. bution in the gastro-intestinal  
WINNE, R. tract of the dog.  
and CUNNINGHAM, R.W. : J. Pharmacol. exp. Therap. 109, 223  
- 232 (1953)
- (45) ELSNER, H.J. The enhancement of serum levels  
STIRN, R.E. of aureomycin in experimental  
DORNBUSCH, A.C. animals.  
and OLESON, J.J. : J. Pharmacol. Exp. Therap. 108, 442  
- 449 (1953)
- (45a) ELSNER, H.J. The metabolic fate of chlortetra-  
and WULF, R.J. : cycline and some comparisons  
with other tetracyclines.  
J. Pharmacol. Exp. Therap. 142, 122  
- 131 (1963)
- (46) HURWITZ, A. Effect of chlortetracycline in  
and CARTER, Ch.E. : regenerating liver.  
Mol. Pharmacol. 5, 350-357 (1969)
- (47) HOBBY, G.L. Absorption and excretion of  
REED, W. Terramycin in animals.  
RINNE, D. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 511-515  
POWRS, M. (1950)  
and D'AMBROSIA, A. :



- (56) GALAMINI, A. Effetto di alcuni antibiotici e  
e MAGGIORE, L. : della vitamina B<sub>12</sub> sull'accres-  
cimento e sulla metamorfosi dei  
girini di Bufo vulgaris.  
R.C.Ist.sup.Sanita 23, 1008-1015  
(1960)
- (57) HURLEY, L.S. Influence of tetracycline on  
and TUCHMANN- pre- and postnatal development  
DUPLESSIS, H. : in the rat. Compt.Rend.257, 302  
- 304 (1963)
- (58) BEVERLANDER, G. The effect on the rat fetus of  
and COHLAN, S.Q. : transplacentally acquired tetra-  
cycline. Biol.Monator.4, 365-370  
(1962)
- (59) BOUCHER, D. : Propriétés abortives des tetra-  
cyclines chez la souris.Traite-  
ments hormonaux. Arch.Sci.Physiol.  
23, 418-516 (1969)
- (59a) BOUCHER, D. : Rétablissement de la nidation  
chez la souris traitée par  
l'aureomycine. Compt.Rend.Soc.  
Biol.163, 1131 (1969)
- (59b) BOUCHER, D. : Action de l'aureomycine sur  
l'implantation chez la souris.  
Compt.Rend.Soc.Biol.162, 1150  
(1968)
- (60) EGER, W. Untersuchungen über die Wirkung  
and ILBAGIAN, K. : von Tetracyclinen auf die Leber.  
Arzneim.-Forsch.(Drug Res.) 12,  
285-289 (1962)
- (61) TAPP, E. Tetracycline Toxicity.  
and LOWE, M.B. : Experientia 29, 530-531 (1966)



- (68) LINDQUIST, R.P.  
and FELLERS, F.X. : Degraded tetracycline nephro-  
pathy; functional, morphologic  
and histochemical observations.  
Labor. Invest. 15, 864-876 (1966)
- (69) LEW, H.T.  
and FRENCH, S.W. : Tetracycline nephrotoxicity  
and nonoliguric acute renal  
failure. Arch. intern. Med. 118,  
123-128 (1966)
- (70) LOWE, M.B.  
and TAPP, E. : Renal damage caused by Anhydro-  
4-epi-tetracycline.  
Arch. Path. (Chicago) 81, 362-364  
(1966)
- (71) STEENDIJK, R. : Studies on the mechanism of the  
fixation of the tetracyclines  
to bone.  
Acta Anat. (Basel) 56, 368-382  
(1964)
- (72) EGER, W.  
und ILBAGIAN, K. : Untersuchungen über die Wirkung  
von Tetracyclinen auf die Leber.  
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 12,  
285-289 (1962)
- (73) MOLITOR, H.  
and GRAESSLE, O.E. : Pharmacology and toxicology of  
antibiotics. J. Pharmac. Exp. Ther.  
98/II, 1-60 (1950)
- (74) LEPPER, M.H.  
WOLFFE, Ch. K.  
ZIMMERMAN, H. J.  
CALDWELL jr., E. R.  
SPIES, H. W.  
and DOWLING, H. F. : Effect of large doses of aureo-  
mycin on human liver.  
Arch. Inst. Med. 88, 271-283 (1951)

- (75) YESNER, R. Preliminary obseravtions on the  
and KUNKEL, P. : effect of aureomycin, terramycin,  
tibione, combined tibione and  
streptomycin and chloromycetin  
on the morphology of the liver  
in man.  
Yale J. Biol. Med. 23, 299-304 (1951)
- (76) LEPPER, M. H. Effect of large doses of aureo-  
ZIMMERMAN, H. J. mycin, terramycin and chloramph-  
CARROLL, G. nicol on livers of mice and dogs.  
Caldwell jr., E. R. Arch. Int. Med. 88, 284-295 (1951)  
SPIES, H. W.  
WOLFFE, Ch. K.  
and DOWLING, H. F. :
- (77) TAPP, E. Tetracycline accumulation in toxic  
and CAROLL, R. : liver damages. J. Path. Bact. 89,  
715-721 (1965)
- (78) TAPP, E. Tetracycline fluorescence in ex-  
KOVACS, K. perimental lesions of the adrenal  
and CAROLL, R. : gland. J. Path. Bact. 91, 241-246 (1966)
- (79) TAPP, E. : Tetracycline labelling methods of  
measuring the growth of bones in  
the rat.  
J. Bone Joint Surg. 48 B, 517-525  
(1966)
- (80) KLIMOVA, N. E. : Study of absorption and distribu-  
tion of Erythromycin, Oleandomycin,  
Tetracycline and Oletrin on experi-  
mental model of chick embryo.  
Antibiotiki 12, 1078-1082 (1967)

- (81) HURLEY, L.S. Influence of tetracyclines on  
and TUCHMANN- pre- and postnatal development  
DUPLESSIS, H. : in the rat. Compt.Rend.257,  
302 - 304 (1963)
- (82) BEVELANDER, G. The effect on the rat fetus of  
and COHLAN, S.Q. : transplacentally acquired tetra-  
cycline. Biol.Neonat.4,365-370  
(1962)
- (83) KOKHANOVSKAJA, T.M. Characteristics of antibiotic  
DZHUMANBAEVA, A.A. distribution in the organs and  
and POPOVA, G.O. : tissues of chicken embryos.  
Antibiotiki 8,816-821 (1963)
- (84) KOKHANOVSKAJA, T.M. Dynamics of antibiotic concentra-  
POPOVA, G.O. tion in the chick embryo.  
and DZHUMANBAEVA, A.A. : Antibiotiki 8,934-939 (1963)
- (85) HUGHES, W.H. A comparative study of the actions  
LEE, W.R. of six tetracyclines on the deve-  
and FLOOD, D.J. : lopment of the chick.embryo.  
Brit.J.Pharmacol.25,317-323(1965)
- (86) BARKALAYA, A.L. : Problem of the effect of tetra-  
cycline on the fetus.  
Antibiot.Advanc.Res.Prod.Clin.  
Use.Proc.Congr.Prague,1964,  
371-373 (1965)
- (87) KELLY, R.G. Tissue distribution of tetra-  
and KANEGIS, L.A. : cycline and chlortetracycline  
in the dog. Toxicol.Appl.Pharmac.  
11,114-120 (1967)
- (88) KELLY, R.G. The metabolism and tissue distri-  
KANEGIS, L.A. bution of radioisotopically  
and BUYSKE, D.A. : labeled demethylchlortetracycline.  
J.Pharmac.Exp.Therap. 134,320-324  
(1961)



- (89) BENNETT, J.V. Comparative serum binding of  
MICKELWAIT, J.S. four tetracyclines under simu-  
BARRETT, J.E. lated in vivo conditions.  
BRODIE, J.L. Antimicrob.Ag.Chemother.1965,  
and KIRBY, W.M.M. : Am.Soc.Microbiol.180-182(1966)
- (90) JAYARAJ, S. The effect of certain antbio-  
EHRHARDT, P. tics on reproduction of the  
and SCHMUTTERER, H. : black bean aphid, *Aphis fabae*  
Scop. Ann.apl.Biol.59,13-21  
(1967)
- (91) OPPERBECK, J. : Nebenwirkungen bei der Therapie  
mit Tetrazyklinen unter beson-  
derer Berücksichtigung der  
Zahnschäden. Zschr.Laryngol.  
Rhinol.Otol.50,393-401 (1971)
- (92) SCHALKHÄUSER, K. Verteilung von Tetracyclin  
BÜRGER, D. (Reverin) in erkrankten Nieren-  
und Prostata-Geweben beim  
HESS, K. : Menschen. Med.Klin.69,582-586  
und SCHNEIDER, W. (1974)
- (93) SCHÖLKENS, B. Circulatory effects of intra-  
GERHARDS, H. venously administered Roli-  
and LINDNER, E. : tetracycline and other tetra-  
cyclines in animal experiments.  
Arzneim.-Forsch.(Drug Res.) 24,  
312-317 (1974)
- (94) KELLY, R.G. Metabolism and tissue distri-  
and KANEGIS, L.A. : bution of radioisotopically labe-  
labeled Minocycline.  
Toxicol.Appl.Pharmac.11,171-183  
(1967)
- (95) WEINSTEIN, L. : The Tetracyclines.  
In GOODMAN, L.S. and GILMAN, A.:  
The Pharmacological Basis of  
Therapeutics, fourth edition,  
Macmillan Company.1970

- (96) RUMMEL, H.H. : Nil nocere ! Antibiotika und Sulfonamide in der Schwangerschaft (Plazentapassage und fetale Toxizität. Münchn.Med.Wschr.104,1870-1872 (1962)

Literaturverzeichnis : Zusammenfassung

- HARRISON, R.G. : The outgrowth of nerve fiber as a mode of protoplasmic movement.  
J.Exp.Zool.9,787 (1910)  
reprinted in J.Exp.Zool.142,5-73  
(1959)

## Zusammenfassung

An fast 7 000 Zell- und Gewebekulturen wurden zyto-morphologische Untersuchungen über die Wirkungen von Antibiotika durchgeführt und mit ähnlichen Ergebnissen anderer Autoren verglichen.

Obwohl die in der Kultur, am Tier und am Menschen erhobenen Befunde oft widersprüchlich sind, wird der Beweis erbracht, daß die Antibiotika sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Gewebe unter ganz spezifischen Bedingungen ausüben können.

Die Reaktionen der Zellen und Gewebe sind dosisabhängig und Depressionen der Mitose treten nach Antibiotikakonzentrationen auf, die in gleicher Höhe wie die therapeutischen Dosen oder über diesen liegen.

Im Hinblick auf die Problemstellung sollte hier der Versuch gemacht werden, auf die Neben- und Schad-Wirkungen der Antibiotika aufmerksam zu machen.

Denn die Biologie, die Biochemie und nicht zuletzt die Biotransformation in der Kultur könnten neue Ausblicke auf die Therapie beim Menschen ergeben.

Aus diesen hier vorgelegten Untersuchungen folgert eine Äquivalenz der Reaktionen der Zellen und Gewebe in der Kultur bei folgenden Grenzkonzentrationen.

| Antibiotikum             | Toleranz-Dosis   | Gewebe             | Depression<br>einleitend | Depression<br>komplett |
|--------------------------|------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
|                          | $\mu\text{g/ml}$ |                    | $\mu\text{g/ml}$         | $\mu\text{g/ml}$       |
| <u>PENICILLIN:</u>       |                  |                    |                          |                        |
| PENICILLIN G             | 60 - 120         | Kardial-<br>muskel | 500                      | 1 000                  |
|                          |                  | Koronar-<br>gefäße |                          |                        |
|                          |                  | Os front.          |                          | 4 000                  |
|                          |                  | Haut               |                          |                        |
|                          |                  | Lunge              |                          |                        |
|                          |                  | Darm               |                          |                        |
|                          |                  | Milz               |                          |                        |
| <u>AMINOGLYKOSIDE:</u>   |                  |                    |                          |                        |
| STREPTOMYCIN             | 50 - 100         | Kardial-<br>muskel | 250 - 1 000              | 2 000 -<br>10 000      |
|                          |                  | Koronar-<br>gefäße |                          |                        |
|                          |                  | Os front.          |                          |                        |
|                          |                  | Haut               |                          |                        |
| DIHYDRO-<br>STREPTOMYCIN | 0,04             | Koronar-<br>gefäße | 1 000                    |                        |
|                          |                  | Os front.          |                          |                        |
|                          |                  | Haut               |                          |                        |
| KANAMYCIN                | 0,015            | Koronar-<br>gefäße | 0,004                    | 4                      |
|                          |                  | Os front.          |                          |                        |
|                          |                  | Haut               |                          |                        |
| GENTAMYCIN               | 0,8              | Kardial-<br>muskel | 0,5 mg/1ml               | 1 mg/1ml               |
|                          |                  | Koronar-<br>gefäße |                          |                        |
|                          |                  | Os front.          |                          |                        |
|                          |                  | Iris               |                          |                        |
|                          |                  | Leber              |                          |                        |
|                          |                  | Haut               |                          |                        |
|                          |                  | Darm               |                          |                        |
|                          |                  | Knochenmark        |                          |                        |
|                          |                  | Lunge              |                          |                        |
|                          |                  | Milz/Niere         |                          |                        |

| <u>TETRACYCLINE</u> | Aus-<br>gangs-<br>Konz.<br>mg/ml | Test-<br>konz.<br>1 gtt=<br>0,02 ml | Gewebe                           | Reakt.                            | Depression<br>einl./kompl.<br>mg/ml |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| HOSTACYCLIN         | 1,25                             | 0,025 mg<br>2,5 /ug<br>25 /ug       | Kardialm.<br>Koronarg.<br>Haut   | Inhib.<br>Prol.<br>verz.<br>Prol. | 1,25 3,0                            |
|                     | 1                                | 0,025 mg                            | Kard.<br>Haut                    | Inhib.                            |                                     |
|                     | 0,01                             | 0,2 /ug                             | Koron.                           | Hemmg                             |                                     |
|                     | 1                                | 0,25 mg                             | Koron.<br>Kard.<br>Darm,<br>Haut | Inhib.                            |                                     |
|                     |                                  |                                     |                                  |                                   |                                     |
| TETRACYN            | 1                                | 0,02 mg                             | Human-<br>haut                   | starke<br>Inhib.                  | 1 2                                 |
|                     | w.o.                             | w.o.                                | Hühner-<br>haut                  | starke<br>Prolif.                 |                                     |
|                     | 2                                | 0,04 mg                             | Haut                             | Inhib.                            |                                     |
|                     | 1                                | 0,02 mg                             | Kard.<br>Leber<br>Haut           | Inhib.                            |                                     |
|                     | 2                                | 0,04 mg                             | O.f.Koron.                       | Inhib.                            |                                     |
|                     | 4                                | 0,08 mg                             | Haut                             | Inhib.                            |                                     |
| TERRAMYCIN Ø        | 0,04                             | 0,08 /ug                            | Hum.Ht.<br>Hühner-<br>Haut       | ger.Prol. 2<br>gute<br>Prolif.    | 3                                   |
|                     | 0,2                              | 4 /ug                               | Hum.Ht.                          | mäß.Prol.                         |                                     |
|                     | 1                                | 0,02 mg                             | U.c.Ht                           | k.-ger.<br>Prol.                  |                                     |
|                     | 2                                | 0,04 mg                             | U.c.Ht                           | ger.Pr.                           |                                     |
|                     | 4                                | 0,08 mg                             | U.c.Ht                           | st.Inhib.                         |                                     |
|                     |                                  |                                     |                                  |                                   |                                     |
| REVERIN             | 2,75                             | 0,05 mg                             | Kard.Epi.                        | Unruhe                            |                                     |
|                     | 1                                | 0,02 mg                             | Kard.,Leb.<br>Haut               | Inhib.                            |                                     |
|                     | 0,1                              | 2 /ug                               | Kard.Haut<br>O.f.Koron.          | st. Prol.                         |                                     |
|                     | 0,2                              | 4 /ug                               | Hum.Ht                           | st. Inhib.                        | 2,75 3                              |
|                     | 0,04                             | 0,8 /ug                             | Kard.Koro.<br>O.f.Leb.Ht.        | ger.Inhib.                        |                                     |
|                     | 0,02                             | 0,4 /ug                             | Leb.Ht.                          | st. Inhib.                        |                                     |
|                     | 0,004                            | 0,08 /ug                            | Kard.Koro.<br>Leb.               | Inhib.                            |                                     |
|                     |                                  |                                     |                                  |                                   |                                     |

| <u>TERRACYCLINE</u> | Aus-<br>gangs-<br>Konz.<br>mg/1 ml | Test-<br>konz.<br>1 gtt=<br>o,02 ml | Gewebe                  | Reak-<br>tion     | Depression<br>einl./kompl.<br>/ml |
|---------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| REVERIN             | o,004 mg                           | o,08 /ug                            | Ht.O.f.                 | mäß.Prol.         | 2,75 mg 3 mg                      |
|                     | "                                  | "                                   | Hum.Ht.                 | mäß.Prol.         |                                   |
|                     | "                                  | "                                   | Kard.Koro.<br>Leb. O.f. | gute Prol.        |                                   |
|                     | "                                  | "                                   | Nier.Haut               | gute Prol.        |                                   |
|                     | o,25 mg                            | 5 /ug                               | Hum.Ht.                 | ger.Prol.         |                                   |
| ACHROMYCIN          | 2,5 mg                             | o,05 mg                             | Koron.<br>Darm          | Inhib.            | 2 mg 4 mg                         |
|                     | W.O.                               | W.O.                                | Haut                    | gute<br>Prol.     | 1 mg                              |
|                     | 5 mg                               | o,1 mg                              | Haut                    | ger.<br>Prol.     |                                   |
|                     | 10 mg                              | o,2 mg                              | Haut                    | ger.Prol.         |                                   |
| RONDOMYCIN          | 1 mg                               | o,02 mg                             | Hu.Ht.                  | Inhib.            |                                   |
|                     | o,5 mg                             | o,01 mg                             | Hu.Ht.                  | Inhib.            | o,5 mg 1 mg                       |
|                     | o,25 mg                            | 5 /ug                               | Hu.Ht.                  | Prol.             |                                   |
|                     | o,125 mg                           | 2,5 /ug                             | Hu.Ht.                  | gute Prol.        |                                   |
|                     | o,06 mg                            | 1,2 /ug                             | Hu.Ht.                  | sti.Prol.         |                                   |
|                     | o,06 mg                            | 1,2 /ug                             | Hü.Ht.                  | sti.Prol.         |                                   |
| VIBRAMYCIN          | o,04 mg                            | o,8 /ug                             | Hü.Ht.                  | sti.Prol.         | 1 mg 4 mg                         |
|                     | 1 mg                               | o,02 mg                             | Hu.Ht.                  | ger.Prol.         |                                   |
|                     | 1 mg                               | o,02 mg                             | Hü.Ht.                  | Inhib.            |                                   |
|                     | 2 mg                               | o,04 mg                             | Hü.Ht.                  | gute Prol.        |                                   |
|                     | 4 mg                               | o,08 mg                             | Hü.Ht.                  | Inhib.            |                                   |
|                     | 2 mg                               | o,04 mg                             | O.f.<br>Koronar.        | gute<br>Prolif.   |                                   |
| MINOCYCLIN          | o,4 /ug                            | o,008 /ug                           | Hu.Ht.                  | mäß.geh.          | o,4-o,8 /ug 1 mg                  |
|                     |                                    |                                     | Kard.O.f.<br>Leb.Lu.Ht. | mäßige<br>Prolif. |                                   |
|                     | o,2 mg                             | 4 /ug                               | Hu.Ht.                  | Inhib.            |                                   |
|                     | "                                  | "                                   | Leb.Nier.               | gute Prol.        |                                   |
|                     | o,1 /ug                            | o,002 /ug                           | Magen                   | mäß.Inhib.        |                                   |
|                     | o,02 mg                            | o,4 /ug                             | Leber                   | mäß.Prol.         |                                   |
|                     | o,04 mg                            | o,01 mg                             | Haut                    | mäß.Prol.         |                                   |
|                     | o,01 mg                            | o,2 /ug                             | Hu.Ht.                  | gute Prol.        |                                   |
|                     | 2 /ug                              | o,04 /ug                            | versch.                 | sti.Prol.         |                                   |

Nach den hier vorgelegten Untersuchungen ist es dringend geboten, dem Therapeuten zu empfehlen, auch über die "drug safety" nachzudenken: über die Reaktion des Organismus auf so diffizile Arzneisubstanzen, wie sie die Antibiotika darstellen.

Wenn z.B. eine Patientin 1 Mega Penicillin in den Oberschenkel injiziert erhält, so entsteht lokal ein sehr großer "pool" des Antibiotikums, der zu einer Nekrose führen könnte, wenn die schnelle Ausschwemmung dies nicht verhindert. So bleibt nur ein minimaler lokal-pathologischer Prozess.

Anders aber ist es in Geweben, die nicht so stark der Durchströmung unterliegen.

Die Analyse der Arzneimittelwirkungen, hier sind besonders die Antibiotika angesprochen, hat ergeben, daß es kaum einen Stoffwechselvorgang im menschlichen und im tierischen Organismus und auch im Explantat gibt, der sich der Einwirkung von außen zugeführter biologisch-aktiver Substanzen entziehen kann. Besonders wichtig sind daher Untersuchungen an Pharmaka, die mit dem Zellkern, mit den Zellorganellen und dem Zytoplasma Verbindungen eingehen und auf Funktionen einwirken, von denen wir wissen, daß sie die Vermehrung und die Differenzierung von Zellen beeinflussen können.

Ein neuer Zweig der Pharmakologie, die "Umwelttoxikologie" bedingt durch die Technisierung der Landwirtschaft, setzt bei Tierernährung und Tierhaltung Pharmaka ein, um eine Produktionssteigerung zu erzielen. Diese Fremdstoffe, besonders Antibiotika, gelangen über Fleisch, Milch und Eier in den Organismus des Menschen und könnten am Ort der Deposition zu unerwarteten Reaktionen führen. Auch darum wurden diese Untersuchungen gestartet, um herauszufinden, wie kleinste Mengen von Antibiotika im Organismus zu wirken vermögen. -



Die Rolle der Gewebekultur in der Pharmakologie ist unbestritten, denn schon HARRISON konnte 1910 unbewußt den geringen toxischen Effekt des PENICILLINS für tierische Zellen voraussehen. Im Hinblick auf die Ähnlichkeit von metabolischen Abläufen in Mikroorganismen, in höheren Organismen und bei Geweben und Zellen in Kultur ist es verwunderlich, daß einige Wirkstoffe auf alle drei eine Aggressivität ausüben.

Die Einzelheiten der Versuchstechnik, wie Zusammensetzung des Nähemediums, Explantatgröße und Dosierung der Testsubstanz standen in einer engen Relation.

Die zytotoxische Wirkung der Antibiotika führte zu einer Auflockerung und Vakuolisierung des Zytoplasmas. Die mitotische Aktivität wird durch interne zelluläre und nukleäre Blockierungen gestört. Eine Inhibition zellinterner Organellen, wie der Mitochondrien und der Ribosomen, ist nicht auszuschließen.

Ziel dieser Untersuchungen über die Wirkungsweise von vielen unterschiedlichen antimikrobiellen Wirkstoffen ist ihre biologische, extrakorporale Wirkung auf sensitive Zellen mit einer Wechselwirkung zwischen dem Hemmstoff und seinem biochemischen Wirkunsort in Beziehung zu bringen. Es kann diese Wechselwirkung auf molekularer Ebene vielleicht noch besser ausgedeutet werden. Aus diesem Grunde müssen chemische Struktur und spezifische Eigenschaften des hemmenden Moleküls in eine enge Korrelation gebracht werden, um in allen Einzelheiten verstanden zu werden.

Bei den komplexen Antibiotika gibt es Strukturen mit aktiven Molekülen oder Seitenketten. Kleine Veränderungen könnten entweder zur vollständigen Inaktivierung oder zu einer ganz anderen Aktivierung vielleicht in Richtung auf eine neue Aktivität, wie bei den hier vorgelegten Arbeiten, führen.

Da bisher beim Menschen widersprüchliche und keine eindeutigen Beweise für Aktivitäten der Antibiotika vorliegen, wurden diese Untersuchungen durchgeführt. Sie sollen nicht nur für die Antibiotika-Forschung, sondern auch für die Therapie und letztlich auch für die Arzneimittel-Gesetzgebung einen Denk-Anstoß geben.

Sämtliche hier ausgetesteten Antibiotika wurden unter gleichen, jederzeit reversiblen Bedingungen, untersucht. Die Pharmazeuten kennen diese Untersuchungs-Methode kaum. Daher ist diese vorliegende Arbeit das konkrete Beispiel, wie man künftig die Nebenwirkungen von Arzneimitteln prüfen könnte, um Schäden am Patienten zu verhüten. Bei der Neueinführung von Präparaten in die Theorie sollten vorher alle Möglichkeiten der Aufdeckung von Neben- und Schadwirkungen, auch durch die Testung an Gewebekulturen, ausgeschöpft werden. Besonders bei teratogenen Wirkungen stellt die Gewebekultur eine schnelle und elegante Untersuchungs-Methode zum allgemeinen Nutzen dar. -



## Lebenslauf

Am 27.7.1921 wurde ich als Sohn des Dr.med.Erich Lipp und seiner Ehefrau Marie Lipp geb. Becker zu Dillenburg/ Hessen geboren. Vom 1. April 1927 bis 31. März 1930 besuchte ich die Grundschule zu Dillenburg. Nach Versetzung meines Vaters nach Berlin zum 1. April 1930 besuchte ich noch ein Jahr die Volksschule in Berlin-Mariendorf, trat am 1. April 1931 in die Eckner-Oberrealschule in Berlin-Mariendorf ein und beendete diese Schulzeit mit dem Abitur März 1939.

Im Sommersemester 1939 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin, Hauptfach Biologie, Nebenfächer Chemie und Geographie.

Im Jahre 1940 leistete ich vom 19. August bis 21. Dezember an Stelle des Arbeits- und Wehrdienstes den studentischen Ersatzdienst ab. Mein Studium endete nach Absolvierung aller erforderlichen Praktika mit der Schließung der Universität bei Kriegsende.

Seit 1941 bis September 1947 war ich als wissenschaftlicher Hilfsarbeiter am Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Landwirtschaftlichen Hochschule, später Universität Berlin, tätig. Vom 1.5.1949 bis 31.7.1951 arbeitete ich am Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 80, über die Karzinogenese bei Tieren und Pflanzen.

Am 11. Oktober 1950 bestand ich an der Humboldt-Universität zu Berlin die Diplom-Hauptprüfung für Biologen. Von Juni 1952 bis Ende September 1953 war ich im Rahmen des ERP-Programmes am Institut für Vererbungs- und Züchtungsforschung mit wissenschaftlichen Fragen betreffend natürliche Polyploide als wissenschaftlicher Hilfsarbeiter eingestellt. Vom 1. Oktober 1953 bis 31. Oktober 1954 wurde durch meine Arbeiten am Max-Planck-Insti-

tut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie, Abt. für Gewebeforschung, Frau Prof.Dr. E. Knake, der Grundstein für meine heutigen Arbeiten gelegt.

In der Zeit vom 13. September 1955 bis Ende März 1956 richtete ich in der Frauenklinik der Freien Universität im Städtischen Krankenhaus Moabit ein Speziallaboratorium für zytologische Untersuchungen ein und kultivierte dort Tumor- und andere Gewebe des weiblichen Genitaltraktes.

Seit Mitte November 1957 arbeitete ich am Pathologischen Institut des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses. Dort erstellte ich eine vollständig unabhängig arbeitende Zell- und Gewebekultur-Abteilung. Am 16. November 1960 trat ich zur Hautklinik der Freien Universität im Rudolf-Virchow-Krankenhaus über und werde dort seitdem als wissenschaftlicher Mitarbeiter geführt.

In den Jahren 1969 bis 1973 erhielt ich einen Forschungsauftrag des Bundesgesundheits- bzw. des Bundesinnenministeriums in Bonn mit dem Thema: "Wirkung von Kraftfahrzeug-Abgas-Komponenten auf Gewebekulturen". Nach erfolgreicher Durchführung dieser Untersuchungen beschäftige ich mich jetzt vornehmlich mit Forschungen über Tumoren der Haut und allgemeiner Grundlagenforschung.





